

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Potencial diagnóstico y terapéutico de los receptores nucleares LXR en la enfermedad inflamatoria intestinal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Miranda Bautista

DIRECTORES

Luis Alberto Menchén Viso
Juan Antonio Rodríguez Feo
Rafael Bañares Cañizares

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Potencial diagnóstico y terapéutico de los receptores nucleares

LXR en la enfermedad inflamatoria intestinal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

JOSÉ MIRANDA BAUTISTA

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:

LUIS ALBERTO MENCHÉN VISO

JUAN ANTONIO RODRÍGUEZ FEO

RAFAEL BAÑARES CAÑIZARES

Madrid, 2020

“Guess I’ve got that old travellin’ bone
‘cause this feeling won’t leave alone
but I won’t, won’t
be loosin’ my way
long as I can see the light”

John Fogerty. Creedence Clearwater Revival

A mi abuelo Fidel

A mis padres Nani y José

A mis hermanos Blanca, Santi y Juan

A Jaime

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda de **Juanan**, bioquímico y uno de los directores de esta tesis. Ha sido mi guía todos estos años, permitió que me pegase a él y se ha esforzado en que este trabajo fuese bueno y a la vez fuese mío. Así mismo, quiero agradecer de manera muy especial la labor de **Rafael Bañares** y **Luis Menchén**. Tengo la suerte de compartir mi día a día con ellos, y son personas que me han mostrado que el saber no ocupa lugar y que plantearse preguntas desde el ámbito clínico es el inicio del proceso investigador. A Luis quiero agradecerle su tutela todos estos años, su dedicación para formarme desde el punto de vista investigador, clínico y humano. Él es el punto de partida de este trabajo, y de muchos otros, y de mi interés por la enfermedad inflamatoria intestinal. Y a Rafa, que siempre ha tenido un rato para mí, para orientarme y para comentar nuestras pasiones comunes (la música, la montaña). No conozco a nadie con más entrega en cada cosa que hace.

Quiero agradecer al grupo de Hepatogastro del Experimental, y en especial a **Marta Puerto**, sin cuyo trabajo todo hubiese sido mucho más complicado. Desde el principio siempre ha mostrado disposición permanente, sentido práctico para la resolución de los problemas y compromiso. **Beatriz López**, compañera de muchas tardes, siempre ha estado dispuesta a ayudarme cuando se lo he pedido. Así mismo, he recibido el inestimable apoyo de **Raquel González**, **David Martín** (UCM), **José Manuel** (Anatomía patológica) y **Matilde** (UCM).

He de agradecer a **Cecilia**, **Paola**, **Mileidis**, **Carmen**, **Celia**, **Esperanza**, **Rodrigo**, **María**, **Raquel**, **Helena**, **Jon**, **Almudena**, **Antonio**, **Javi Gordillo** y **José Carlos** su ayuda en la recogida de muestras desde la Unidad de Endoscopias.

Muchas personas en el laboratorio han hecho que el día a día fuese gratificante, siempre dándome ánimos y consejos e interesándose por la evolución del trabajo. He de citar a **Javier Vaquero, Carolina, Juan José, Alberto Lázaro, Jose Nefro, Marian, Christian, Laura, Maribel, José María Bellón, Rafa Samaniego, Begoña Quintana**. No puedo dejar de mencionar a **Alberto Tejedor**, espléndido docente e investigador. No te olvidaremos.

Quiero agradecer a las personas que ya estaban pero que me han ayudado durante estos años. **Iñaki** por ser uno de mis modelos a seguir, y ser otro reflejo de lo que se puede hacer en ciencia básica siendo médico; **Esther, Leti, Cespo**, por las veces que no he podido quedar con ellos y por las que llegué tarde por hacer este trabajo; **Juan Mangas**, gran científico y mejor amigo y persona, por transmitirme su motivación por la ciencia.

Por último, quiero hablar de mi familia, en especial de **mi abuelo Fidel**, hombre hecho a sí mismo y modelo a seguir en cuanto a esfuerzo, rectitud y entrega por los suyos. Siempre pensé que un trabajo como este le haría sentir orgulloso. A **mis padres**, solo tengo palabras de agradecimiento por los valores que me han inculcado, lo que soy es gracias a ellos. Los dos, cada uno con su estilo, son lo que quiero ser. A **mis hermanos Blanca, Santi y Juan**, que aunque yo soy el mayor siempre he pensado que me enseñan mucho más ellos, y siento verdadero orgullo por cada logro que consiguen. Por ellos he sacado este trabajo adelante.

Una persona me dijo una vez: “sacar adelante una tesis conlleva estar muy agradecido a mucha gente, porque sin ayuda nadie lo consigue”. Ahora lo entiendo.

GRACIAS

ABREVIATURAS

A continuación se recoge la relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En ocasiones se ha mantenido la correspondiente abreviatura y definición en inglés debido a su mayor uso en el lenguaje científico:

Abreviatura	Definición
ABCA1	Transportador dependiente de ATP A1
ABCG1	Transportador dependiente de ATP G1
ADNc	ADN complementario
ARNm	ARN mensajero
ASCA	Anticuerpos anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CEI	Célula epitelial intestinal
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CU	Colitis ulcerosa
CI	Colitis inclasificable
CCR	Carcinoma colorectal
DSS	Sulfato dextrano sódico
EC	Enfermedad de Crohn
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas
FAS	Sintasa de ácidos grasos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-1R	Receptor de interleucina 1
IL	Interleucina
IL10 ^{-/-}	Ratón deficiente en IL-10
ILC	Células linfoides innatas
iNOS	Forma inducible de la óxido nítrico sintasa
JAM-A	<i>Junctional adhesion molecule A</i>
JNK	Quinasa c-Jun NH2-terminal
KO	Animal defectivo para un gen. <i>Del ingles "knock out"</i>
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
LXR	Receptor hepático X. Si no se hace distinción se refiere a ambas isoformas α y β
MAP quinasas	Proteína quinasas activadas por mitógenos
MDP	Muramil dipéptido
MMP-9	Metalopectidasa de matriz 9
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa en las células B
NOD2	Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PLTP	Proteína de transferencia de fosfolípidos
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RN	Receptores nucleares
RXR	Receptor retinoide X
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta
SES-CD	Índice endoscópico simplificado para la enfermedad de Crohn
SREBP1c	Proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1c
siARN	ARN pequeño de interferencia
SPF	Organismos libres de patógenos específicos
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TCR	Transporte reverso de colesterol
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
TNBS	2,4,6-ácido sulfónico de trinitrobenzeno
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
ZO-1	<i>Zonula occludens 1</i>

ÍNDICE

1	RESUMEN	21
2	SUMMARY	27
3	INTRODUCCIÓN	33
3.1	LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.....	33
3.1.1	<i>Estructura y funciones de la mucosa del colon.....</i>	33
3.1.2	<i>La enfermedad inflamatoria intestinal.....</i>	34
3.1.2.1	Colitis ulcerosa.....	35
3.1.2.2	Enfermedad de Crohn.....	36
3.1.3	<i>Epidemiología de la EII.....</i>	36
3.1.4	<i>Etiopatogenia.....</i>	36
3.1.5	<i>Diagnóstico.....</i>	39
3.1.5.1	Colitis ulcerosa.....	39
3.1.5.2	Enfermedad de Crohn.....	40
3.1.5.3	Limitaciones diagnósticas.....	40
3.1.6	<i>Tratamiento.....</i>	41
3.1.7	<i>Modelos animales de EII.....</i>	42
3.1.8	<i>Disfunción de barrera en la inflamación mucosa.....</i>	44
3.1.9	<i>El sistema inmune asociado a la mucosa digestiva en la EII.....</i>	45
3.1.9.1	Citocinas y quimiocinas en la EII.....	49
3.2	RECEPTOR HEPÁTICO X	51
3.2.1	<i>Receptores nucleares</i>	51
3.2.2	<i>Descripción y mecanismo de acción de LXR.....</i>	52
3.2.3	<i>Ligandos endógenos y agonistas sintéticos de LXR</i>	53
3.2.4	<i>Funciones de LXR.....</i>	54
3.2.4.1	LXR en el metabolismo lipídico.....	54
3.2.4.2	LXR en el metabolismo de la glucosa	56
3.2.4.3	LXR y cáncer.....	56
3.2.4.4	LXR e inflamación	56
3.2.4.5	LXR y enfermedad inflamatoria intestinal.....	58
3.2.4.6	Relevancia de ABCA1 en el efecto de LXR sobre la cascada inflamatoria y sobre la proliferación observada en el cáncer	59
4	HIPÓTESIS	63
4.1	JUSTIFICACIÓN	63

4.2	HIPOTESIS GENERAL	64
4.3	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	64
5	OBJETIVOS	66
5.1	PRINCIPAL	66
5.2	ESPECÍFICOS.....	66
6	PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS	68
6.1	CONSIDERACIONES GENERALES.	68
6.2	MATERIALES.....	68
6.2.1	<i>Reactivos, soluciones y tampones.</i>	68
6.2.2	<i>Anticuerpos primarios</i>	70
6.2.3	<i>Anticuerpos secundarios</i>	71
6.2.4	<i>Primers</i>	71
6.3	MÉTODOS	73
6.3.1	<i>Técnicas de laboratorio</i>	73
6.3.1.1	Preparación de las muestras para histología	74
6.3.1.2	Tinción hematoxilina-eosina	74
6.3.1.3	Tinción de azul alcian	74
6.3.1.4	Aislamiento de ARNm.....	75
6.3.1.5	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcriptasa inversa (qPCR). 75	
6.3.1.6	Aislamiento proteico con RIPA.....	76
6.3.1.7	Western blot	76
6.3.1.8	Tinción inmunohistoquímica (IHQ).	77
6.3.1.9	Inmunofluorescencia en tejido.....	77
6.3.1.10	Ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA).....	77
6.3.1.11	Inmunofluorescencia en células cultivadas.....	78
6.3.2	<i>ESTUDIO EN HUMANOS</i>	78
6.3.2.1	Selección y reclutamiento de los pacientes.....	78
6.3.2.2	Criterios de inclusión y exclusión.....	78
6.3.2.3	Colonoscopia.....	79
6.3.2.4	Evaluación clínica, endoscópica e histológica de los pacientes.....	80
6.3.3	<i>ESTUDIO EN RATONES</i>	81
6.3.3.1	Modelo de ratones deficientes en IL-10.....	81
6.3.3.2	Valoración de la inflamación histológica en el colon de los ratones.	82
6.3.4	<i>ESTUDIO EN CULTIVOS CELULARES</i>	82
6.3.4.1	Estudio <i>in vitro</i> en cultivos celulares.	82
6.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	83
7	RESULTADOS	86
7.1	PATRONES DE EXPRESIÓN DE LXR EN BIOPSIAS ENDOSCÓPICAS DE MUCOSA DE COLON.....	86

7.1.1	<i>Características basales de los pacientes</i>	86
7.1.2	<i>Grado afectación endoscópica de los pacientes</i>	89
7.1.3	<i>Grado de afectación histológica. Concordancia endoscopia-histología</i>	90
7.1.4	<i>Niveles de expresión de LXR$\alpha\beta$ por western blot en las biopsias endoscópicas de los segmentos indemne e inflamado de pacientes con EII</i>	92
7.1.5	<i>Evaluación de la expresión de LXR$\alpha\beta$ por IHQ en las biopsias endoscópicas de segmento indemne e inflamado de pacientes con EII.</i>	95
	<i>Localización intracelular de LXR</i>	98
7.1.6		98
7.2	CARACTERIZACIÓN DE LOS RATONES DEFICIENTES EN INTERLEUCINA 10 COMO MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.	99
7.2.1	<i>Cálculo del tamaño muestral</i>	100
7.2.2	<i>Características de la población de animales</i>	100
7.2.3	<i>Evaluación microscópica de la afectación inflamatoria en el colon del ratón.</i>	102
7.2.4	<i>Niveles de expresión de moléculas pro-inflamatorias en el colon del ratón.</i>	103
7.2.5	<i>Niveles de expresión de moléculas de adhesión intercelular y del citoesqueleto en el colon del ratón.</i>	105
7.3	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LXR Y SUS GENES DIANA EN EL COLON DEL RATÓN DEFICIENTE EN IL-10.	107
7.3.1	<i>Niveles de expresión de ARNm de las dos isoformas de LXRα y β en el colon del ratón.</i>	107
7.3.2	<i>Niveles de expresión de genes diana de LXR en el colon.</i>	108
7.3.3	<i>Tinción inmunohistoquímica de LXR en el colon del ratón.</i>	109
7.3.4	<i>Localización intracelular de LXR$\alpha\beta$.</i>	113
7.4	EFFECTO DE LA IL-1 β SOBRE LXR EN CULTIVOS CELULARES.	115
7.4.1	<i>Efecto de la estimulación con IL-1β sobre citocinas y quimiocinas de producción epitelial, sobre LXR$\alpha\beta$ y ABCA1.</i>	115
7.5	EFFECTO DEL AGONISTA DE LXR GW3965 SOBRE LA INFLAMACIÓN EPITELIAL.	116
7.5.1	<i>Efecto de GW3965 sobre LXR y sus genes diana en células Caco-2.</i>	117
7.5.2	<i>Efecto de la pre-incubación de células Caco-2 con GW3965 sobre las quimiocinas IL-8 y CCL-28 en cultivos estimulados con IL-1β.</i>	117
7.5.3	<i>Efecto del tratamiento con GW3965 sobre la ruta NF-κB.</i>	118
7.5.4	<i>Efecto del GW3965 sobre la activación de MAP quinasas p44-42</i>	120
7.6	PAPEL MEDIADOR DE ABCA1 SOBRE EL EFECTO ANTI-INFLAMATORIO DE GW3965 Y SOBRE LA VÍA AKT RELACIONADA CON LA DEGENERACIÓN NEOPLÁSICA.	121

7.6.1	<i>Efecto del bloqueo farmacológico de ABCA1 con glibenclamida sobre el efecto anti-inflamatorio de GW3965</i>	121
7.6.2	<i>Efecto del bloqueo farmacológico de ABCA1 con glibenclamida sobre el efecto anti-proliferativo de GW3965</i>	122
8	DISCUSIÓN	124
9	CONCLUSIONES	150
10	REFERENCIAS	152

1 RESUMEN

Título: Potencial diagnóstico y terapéutico de los receptores nucleares LXR en la enfermedad inflamatoria intestinal

Introducción: El término enfermedad inflamatoria intestinal (EII) engloba un conjunto de entidades que se caracterizan por la inflamación crónica del intestino, como consecuencia de la interacción de factores genéticos, medioambientales y microbianos. El receptor nuclear *Liver X Receptor* (LXR) ha mostrado una acción anti-inflamatoria en macrófagos en cultivo. Sin embargo, su relevancia en la fisiología epitelial y en la patogenia de la EII no está establecida.

Hipótesis:

Hipótesis general: La vía de señalización LXR-ABCA1 tiene un papel anti-inflamatorio en el epitelio del colon, y la expresión epitelial de LXR puede estar modificada en la EII.

Hipótesis específicas: i) El porcentaje de núcleos positivos para LXR en el epitelio intestinal tiene capacidad diagnóstica o pronóstica en sujetos con EII. ii) La estimulación de LXR con el agonista específico GW3965 reduce la respuesta inflamatoria inducida por la interleucina 1 β (IL-1 β) en el epitelio intestinal.

Objetivos:

- 1) Valorar el impacto diagnóstico y pronóstico de los cambios de LXR en la mucosa de colon en una cohorte de pacientes con EII en sus tres subtipos principales: colitis ulcerosa (CU), enfermedad de Crohn (EC) y colitis inclasificable (CI).
- 2) Analizar la expresión génica y proteica de LXR y sus genes diana en el colon del ratón deficiente en IL-10 (IL-10^{-/-}).

- 3) Estudiar el efecto de un estímulo inflamatorio sobre el epitelio intestinal en cultivo celular, sobre la expresión de LXR, sus genes diana y quimiocinas.
- 4) Estudiar el efecto de la estimulación farmacológica de LXR sobre el epitelio intestinal.
- 5) Valorar el efecto de la administración de un agonista farmacológico de LXR sobre la expresión de quimiocinas de secreción de células epiteliales intestinales en condiciones *in vitro* de inflamación epitelial, y así validar en la célula epitelial intestinal los datos existentes en el macrófago.
- 6) Identificar el mecanismo del efecto anti-inflamatorio del agonista de LXR en cultivos celulares en condiciones inflamatorias.
- 7) Determinar el papel mediador de ABCA1 sobre el efecto anti-inflamatorio y anti-proliferativo del agonista de LXR.

Materiales y Métodos: Se utilizó una triple aproximación para lograr dichos objetivos:

Muestras de pacientes con EII. Se incluyeron biopsias endoscópicas de mucosa inflamada y endoscópicamente indemne de pacientes con EC, CU y CI, así como controles sanos. Así mismo, se registraron sus variables demográficas y clínicas. Se evaluó la inflamación endoscópica, histológica así como la actividad clínica siguiendo índices validados. Se evaluó la presencia de LXR por medio de western blot e inmunohistoquímica (IHQ).

EII experimental murina. Se utilizaron los ratones IL-10^{-/-} como modelo de ileocolitis crónica, que fueron sacrificados cuando se había establecido la colitis, así como ratones salvajes de la misma edad, y se obtuvo el colon para su análisis. Se valoró la expresión de moléculas pro-inflamatorias y estructurales por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR), inmunofluorescencia

(IF) e IHQ. La expresión de LXR α y LXR β y de sus genes diana se midió por qPCR, y la presencia nuclear de LXR α , LXR α y LXR β por medio de IHQ.

Células epiteliales intestinales en cultivo. Se usaron células Caco-2. Se valoró la expresión de LXR, sus genes diana, de IL-8 y CCL-28 por medio de qPCR. La IL-8 en medio de cultivo se midió por ELISA. Se usó el agonista de LXR GW3965, y el antagonista de ABCA1 glibenclamida. La valoración del paso de p65 de NF- κ B al núcleo se valoró por IF, y la de la fosforilación de MAP quinasas p44-42 y de AKT por western blot.

Resultados:

Muestras de pacientes con EII. Se incluyeron 17 pacientes con EII y 5 controles. En el 86% de los pacientes con EII los segmentos de colon endoscópicamente indemnes presentaron algún grado de inflamación histológica. La presencia de LXR en el total de la muestra endoscópica medida por western blot fue menor en los pacientes con EII con respecto a los sujetos control, si bien no hubo diferencias entre el segmento inflamado y el indemne de los pacientes con EII. La valoración por IHQ mostró que el número de núcleos positivos de LXR α en el epitelio intestinal de los segmentos inflamados es menor que en los endoscópicamente indemnes, mientras que los pacientes control presentaron niveles aún superiores. Este conteo en el segmento indemne se correlacionó negativamente con el valor del índice de Mayo, mientras que el del segmento inflamado se correlacionó negativamente con la edad y el índice histológico de inflamación. La positividad nuclear del segmento indemne se acompañó de negatividad relativa del citoplasma, lo cual es a la inversa en el epitelio inflamado, que presenta escasa tinción nuclear con citoplasma ampliamente teñido.

El experimental murina. El modelo de IL-10^{-/-} presenta inflamación cólica en el estudio histológico, así como aumento de la expresión génica de las moléculas pro-inflamatorias. Los niveles de expresión de LXR α y β y el de sus genes diana son menores en el colon del ratón IL-10^{-/-} con respecto al salvaje. La cuantificación de los núcleos positivos para LXR $\alpha\beta$ en el colon es menor en ratones IL-10^{-/-}, y este descenso es secundario a una menor positividad epitelial y de LXR β . LXR α no presenta cambios. La positividad de los núcleos del epitelio del colon de los ratones salvajes va acompañada de negatividad de la tinción en el citoplasma, mientras que en el IL-10^{-/-} la negatividad del núcleo se acompaña de positividad citoplasmática.

Células epiteliales intestinales en cultivo. La estimulación de las células Caco-2 con IL-1 β condicionó un aumento de IL-8 y CCL-28. La expresión génica de LXR α y β en estas circunstancias no cambió, mientras que se observó disminución de su gen diana ABCA1. El tratamiento con GW3965 aumentó la expresión de ABCA1 pero no de los propios receptores LXR α y β . El GW3965 disminuyó la expresión de IL-8 y CCL-28 que acontece en respuesta a IL-1 β . El tratamiento con GW3965 también disminuyó la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B, así como la fosforilación de las MAP quinasas p44-42 en células estimuladas con IL-1 β . La inhibición farmacológica de ABCA1 contrarresta el efecto del GW3965 sobre la fosforilación de p44-42 en células Caco-2 estimuladas con IL-1 β , así como atenúa el descenso de la fosforilación de AKT en esas condiciones.

Conclusiones:

- El receptor LXR puede jugar un papel relevante en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal como pone de manifiesto su menor expresión génica y

proteica en el colon de pacientes con dicha enfermedad y su relación con la actividad endoscópica e histológica.

- Tanto la expresión génica como la función de LXR en el colon de ratones deficientes en interleucina 10 están disminuidas, lo que se correlaciona de forma inversa con los niveles tisulares de expresión de interleucina 1 β ; ello sugiere una potencial asociación entre la pérdida de función de LXR y la presencia de actividad inflamatoria.

- La activación farmacológica de LXR inhibe la síntesis de quimiocinas pro-inflamatorias en células epiteliales en cultivo estimuladas con interleucina 1 β , por lo que LXR puede constituir una nueva diana terapéutica en la enfermedad inflamatoria intestinal.

- Las vías efectoras de NF- κ B y MAP quinasas son las responsables de dicho efecto anti-inflamatorio, y la conocida relevancia patogénica de estas vías hace especialmente pertinente el planteamiento de la terapia de activación de LXR en la enfermedad inflamatoria intestinal.

- Se ha identificado ABCA1 como una molécula clave en la acción anti-inflamatoria y anti-proliferativa de la vía de LXR.

2 SUMMARY

Title: Potential diagnostic and therapeutic role of the nuclear receptor liver X receptor (LXR) in inflammatory bowel disease.

Introduction: Inflammatory bowel disease (IBD) includes a group of entities characterized by a chronic inflammation of the intestine, of unknown aetiology, consequence of the interaction of genetic, environmental and microbial factors. LXR has been suggested as an anti-inflammatory regulator in macrophages. However, its importance in the physiology of the intestinal epithelial cells (IEC) and in IBD pathogenesis has not yet been established.

Hypothesis: *General hypothesis:* LXR-ABCA1 pathway has an anti-inflammatory effect in the intestinal epithelium, and the expression of LXR is modified in IBD patients.

Specific hypothesis: i) The proportion of LXR positive nuclei in the colonic epithelium has a diagnostic or prognostic role in IBD patients. ii) LXR activation with the LXR agonist GW3965 reduces the inflammatory response in IEC stimulated with interleukin 1 β (IL-1 β).

Aim:

- 1) To assess the diagnostic and prognostic role of LXR expression in the colonic mucosa of patients with IBD.
- 2) To analyse the expression of LXR and its target genes in the colon of the IL-10 deficient mouse (IL-10^{-/-}).
- 3) To investigate the effect of an inflammatory stimulus in cultured IEC on LXR expression, its target genes and chemokine secretion.
- 4) To study the effect of the activation of LXR in cultured IEC.

- 5) To assess the effect of LXR activation in cultured IEC under inflammatory conditions on the expression of epithelium-secreted chemokines, and thus to validate in the IEC the data previously shown in the macrophage.
- 6) To identify the mechanism of LXR anti-inflammatory effect in cultured IEC under inflammatory conditions.
- 7) To determine the anti-inflammatory and anti-proliferative role of ABCA1 in the activation of LXR pathway.

Materials and methods: A triple approach was used in order to reach these aims:

Colonic samples of IBD patients: Endoscopic biopsies of the inflamed and undamaged colon of IBD patients (Crohn's disease, ulcerative colitis and unclassified colitis) and controls were taken. Demographical and clinical variables were registered, as well as endoscopic and pathological data using validated indexes. LXR protein expression was assessed using western blotting and immunohistochemistry (IHC).

Experimental model of IBD: Wild-type and IL-10^{-/-} mice were used, whose genetic background confers ileo-colic inflammation. Both groups were sacrificed when the colitis of the IL-10^{-/-} mice was established, and the colon specimen was removed and measured. Pro-inflammatory and structural molecules were detected using quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR), immunofluorescence (IF) and IHC. LXR and its target genes expression were tested using qPCR and IHC.

Cultured IEC: Caco-2 cells were used. The expression of LXR, its target genes, IL-8 and CCL-28 in IEC extract was evaluated using qPCR. The IL-8 expression in culture media was measured by ELISA. The LXR agonist GW3965 was used, as well as glybenclamide as pharmacologic ABCA1 antagonist. IF was performed to detect

p65 subunit of NF- κ B migration towards the nucleus, and western blotting was used to evaluate MAP kinase p44-42 and AKT phosphorylation in IEC.

Results:

Colonic samples of IBD patients: Seventeen IBD patients and 5 controls were included. Any degree of histologic inflammation was present in 86% of the endoscopically undamaged colonic segments of the IBD patients. There were no differences in LXR protein expression using western blotting in inflamed versus undamaged colonic samples of IBD patients, although a higher presence of LXR was observed in controls. A lower proportion of epithelial LXR $\alpha\beta$ positive nuclei using IHC was observed in the inflamed colonic samples compared with the undamaged ones, and controls showed the highest positivity quantification. The LXR positivity in the undamaged segment negatively correlated with Mayo score, while LXR quantification in the inflamed segment negatively correlated with the age and the histological inflammation score. The nuclear LXR staining observed in the undamaged colonic biopsies was accompanied by an absence of cytoplasmic staining. The findings in the inflamed mucosa were the opposite, showing a cytoplasmic LXR staining with an absence of nuclear staining.

Experimental model of IBD: IL-10^{-/-} mice of 18-20 weeks old exhibited colonic inflammation in the histological study, as well as an increased colonic mRNA expression of pro-inflammatory molecules. The mRNA expression of LXR α and β and its target genes FAS and ABCA1 was decreased in the colon of the IL-10^{-/-} mice compared with Wild-type mice. The quantification of LXR $\alpha\beta$ positive nuclei in colonic specimens of IL-10^{-/-} mice was diminished, and it was due to a lower count in the epithelial compartment and a lower count of LXR β . LXR α did not show any significant change. The nuclear LXR staining observed in the Wild-type mice was

accompanied by an absence of cytoplasmic staining, while a high cytoplasmic LXR dyeing and an absence of the nuclear one was observed in IL-10^{-/-} mice.

Cultured IEC: IL-1 β -challenged Caco-2 cells showed an increased expression of IL-8 and CCL-28, and decreased ABCA1, while LXR α and LXR β expression did not change. Caco-2 cells treated with GW3965 showed increased ABCA1 expression, although LXR α and LXR β neither did change. Moreover, the treatment with the LXR agonist in IL-1 β -challenged Caco-2 cells decreased IL-8 and CCL-28 mRNA expression and IL-8 protein secretion. GW3965 treatment conferred a decrease in the nuclear translocation of p65 subunit of NF- κ B and in the phosphorylation of p44-42 MAP kinases in IL-1 β -challenged Caco-2 cells. Finally, ABCA1 blockage with glybenclamide prevented the decrease in MAP kinases phosphorylation by GW3965 in IL-1 β -challenged Caco-2 cells, as well as in AKT phosphorylation in the same conditions.

Conclusions:

- The nuclear receptor LXR may play an important role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, as evidenced by its lower gene and protein expression in the colon of inflammatory bowel disease patients and its relationship with endoscopic and histological activity of the disease.
- LXR gene expression and function is down-regulated in the colon of IL-10 deficient mice, and it negatively correlates with IL-1 β tissue expression. It suggests a potential association between LXR loss of function and the presence of inflammatory activity in the colon.
- The pharmacologic activation of LXR inhibits the synthesis of pro-inflammatory chemokines in IL-1 β -challenged cultured intestinal epithelial cells, and therefore LXR may constitute a new therapeutic target in the inflammatory bowel disease.

- The NF- κ B and MAP kinases pathways are responsible of the anti-inflammatory effect of LXR activation, and due to the pathogenic relevance of these routes the activation of LXR is especially appropriate in the inflammatory bowel disease patients.
- ABCA1 has been identified as a key molecule in the anti-inflammatory and anti-proliferative effect of LXR activation.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 La enfermedad inflamatoria intestinal.

3.1.1 Estructura y funciones de la mucosa del colon.

El colon es un órgano tubular cuyas funciones principales son el almacenamiento y compactación de los materiales de desecho, la absorción de agua y de las vitaminas K y B12, y el equilibrio de electrolitos. Así mismo concentra una gran cantidad de células del sistema inmune, alberga millones de microorganismos que componen la microbiota, y constituye una gran barrera que protege a los órganos internos del medio externo. Esta **función de barrera** se consigue por la acción combinada de la capa de moco presente en la luz intestinal, los diferentes péptidos antimicrobianos, la existencia de un sistema inmune local y de una monocapa de células epiteliales intestinales (CEI). A nivel paracelular la función de barrera se mantiene gracias a unos sistemas proteicos de anclaje localizados a lo largo de la superficie lateral de las CEI adyacentes. Se dividen en **uniones estrechas**, situadas apicalmente y representadas por la claudinas y las *zonula occludens* (ZO) (1); **uniones adherentes**, subyacentes a las anteriores y entre cuyas proteínas constituyentes destacan las nectinas y las cadherinas, sobre todo la cadherina epitelial (E-cadherina) (2), y los **desmosomas** (3). El reticulón 4B/NOGO-B, una proteína estructural de retículo endoplásmico, ha sido estudiada por nuestro grupo como elemento partícipe de la función de barrera intestinal, merced a su implicación en la expresión de la E-cadherina y la organización de la actina del citoesqueleto en los sitios de unión intercelular, y está disminuida en el colon inflamado de pacientes con EII y en el colon del ratón deficiente en interleucina 10 (IL-10^{-/-}) (4).

La CEI produce y responde a citocinas y quimiocinas, lo que afecta a su proliferación, migración y supervivencia. Entre las citocinas que el epitelio intestinal produce se encuentran las interleucinas (IL) 25, IL-10, IL-6, IL-33 y el *trefoil factor 2*; mientras que también secreta las quimiocinas IL-8, CCL-1 y CCL-20 (5). Además, tiene un importante papel en la inmunidad innata, ya que recluta células inflamatorias e inmunes como neutrófilos y linfocitos B y T.

3.1.2 La enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) comprende principalmente dos entidades (Figura 1): la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), caracterizadas por una inflamación exacerbada y recurrente de la mucosa en la CU y de toda la pared intestinal en la EC (6, 7).

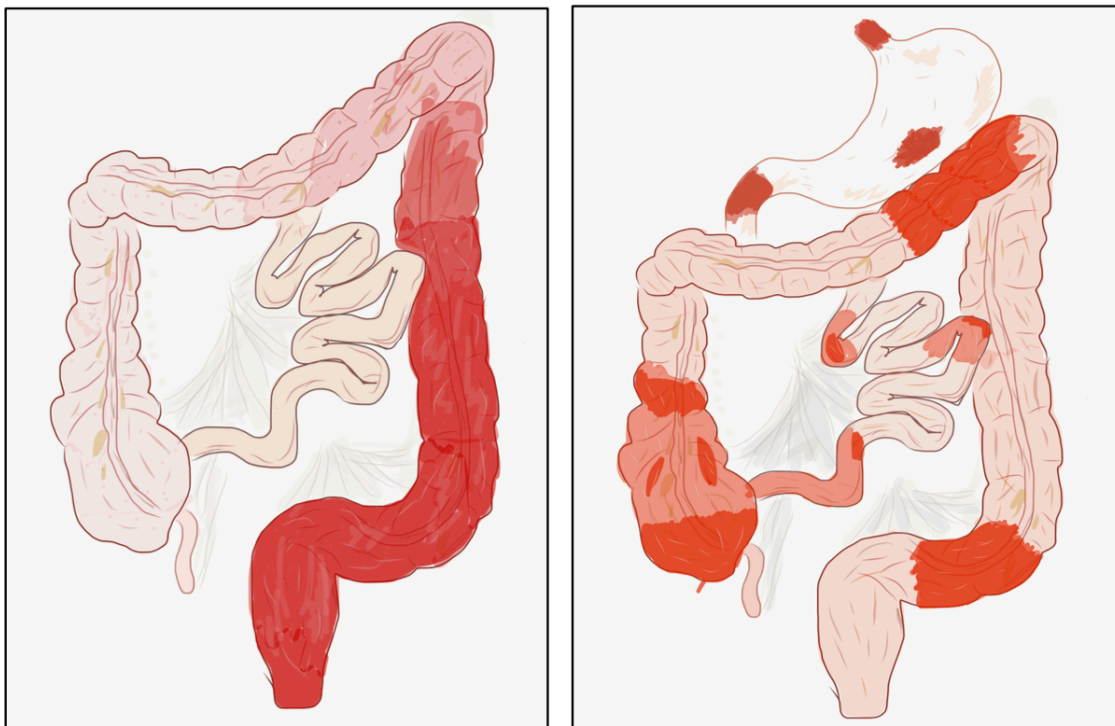


Figura 1: Afectación inflamatoria en la colitis ulcerosa (izquierda) y en la enfermedad de Crohn (derecha).

Existen además otras entidades incluidas dentro del concepto de EII como la colitis inclasificable (CI), entidad inflamatoria del colon que no puede llegar a clasificarse como CU ni como EC; la enfermedad inflamatoria intestinal asociada a la colangitis esclerosante primaria; la colitis microscópica y la reservoritis (8).

El colon es un órgano de vital importancia sobre el que acontecen gran parte de los eventos en la EII. Entre 1-2,5% de los pacientes con CU puede desarrollar un **megacolon toxico** (9), considerada una urgencia vital. Así mismo, la aparición de **carcinoma colorectal** (CCR) es una posible complicación de los pacientes con EII, con una incidencia acumulada en torno al 10,8% a los 40 años del diagnóstico en los pacientes con CU (10) y del 8% a los 22 años en pacientes con EC de colon (11). La **displasia epitelial** es el fenómeno que precede al carcinoma colorectal en pacientes con EII y puede asociarse a un carcinoma sincrónico en las piezas de colectomía. No existen hoy en día marcadores que permitan predecir la degeneración neoplásica de la mucosa del colon más allá de la inflamación persistente y el tiempo de evolución de la enfermedad.

3.1.2.1 Colitis ulcerosa

La CU afecta a la mucosa del colon, de manera constante al recto y puede extenderse de manera continua y en sentido proximal a una longitud variable del colon hasta el ciego. Cursa en forma de brotes y períodos de remisión, y puede presentar manifestaciones más allá del tubo digestivo como la colangitis esclerosante primaria, psoriasis, eritema nodoso y pioderma gangrenoso, uveítis y la artritis (12).

3.1.2.2 Enfermedad de Crohn

La EC es una enfermedad inflamatoria de carácter transmural que puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo, si bien más del 60% de los pacientes tienen afectación del colon (13). Puede asociarse a manifestaciones sistémicas y extraintestinales como anemia, artritis, uveítis y pioderma gangrenoso (14). Por su carácter transmural y cicatricial presenta de manera frecuente fístulas y estenosis del tubo digestivo. Al igual que la colitis ulcerosa, típicamente aparece en forma de brotes agudos que alternan con períodos de remisión clínica (15).

3.1.3 Epidemiología de la EII

La incidencia y prevalencia de la EII en los países industrializados ha ido aumentando en las últimas décadas hasta estabilizarse, mientras que en los últimos años se observa un aumento en los países en desarrollo (16). En España la incidencia alcanza la cifra de 5-12 casos de CU por 100.000 habitantes/año y de 3,5-9,5 casos de EC por 100.000 habitantes/año (17). Aparecen de manera más frecuente en mujeres, con una relación hombre:mujer de 1:1,5 para la EC y 1:1,2 para la CU (18); y además se ha demostrado una mayor probabilidad de manifestaciones extra-intestinales, de resección ileocecal y de recurrencia postquirúrgica temprana en mujeres con respecto a hombres (19). La prevalencia en España se sitúa en los 87,45 casos de EC por cada 100.000 habitantes y 109,96 casos de CU por 100.000 habitantes (20).

3.1.4 Etiopatogenia

La EII se manifiesta como resultado de la interacción de varios elementos, cuya representación esquemática se muestra en la Figura 2:

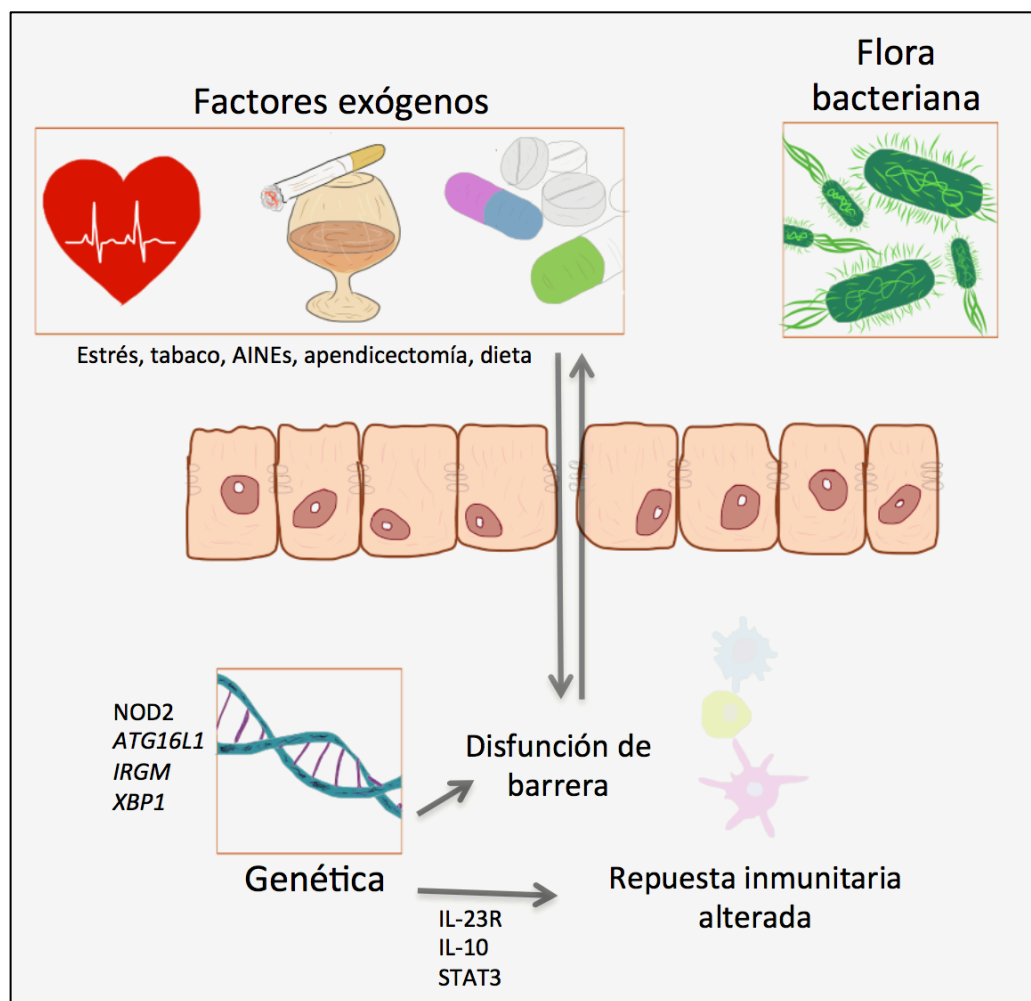


Figura 2: Factores etiopatogénicos de la EII. Factores exógenos como el estrés, el tabaco, los anti-inflamatorios, los antibióticos, la dieta, junto con características de la flora bacteriana en individuos genéticamente susceptibles condicionan alteración de la función de barrera y una respuesta inmunitaria alterada que en última instancia condiciona la aparición de una respuesta inflamatoria descontrolada y la aparición de la enfermedad inflamatoria intestinal.

(i) Factores genéticos. En 2001 se descubrió que el gen llamado dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2 (NOD2) confiere susceptibilidad a la EC (21). NOD2 codifica una proteína que actúa como un receptor intracelular que reconoce el muramil dipéptido, presente en bacterias Gram positivas y negativas e induce autofagia que controla la replicación bacteriana y la presentación antigénica (22, 23). Existen otros genes implicados en la autofagia como *ATG16L1* o *IRGM* que se han relacionado con EC (24, 25), así

como genes relacionados con la cascada inflamatoria como el receptor de IL-23, IL 12B, *JAK2* y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) (26).

(ii) Factores ambientales. El tabaco es el factor ambiental más claramente relacionado con la EII (27). Es un factor de riesgo para el desarrollo y para una peor evolución de los pacientes con EC, si bien la magnitud de esta influencia es objeto de discusión (28). Sin embargo, el tabaco parece ejercer un efecto protector en la aparición de la CU (29). Por otro lado, el alcohol puede condicionar un empeoramiento sintomático en los pacientes con EII (30). Así mismo, el curso de la EII podría estar influido por el tratamiento con AINES, y el riesgo de padecerla aumenta con el tratamiento previo con antibióticos, sobre todo en la infancia (31). Otro factor importante es la dieta, ya que la nutrición enteral total se ha asociado a mejoría clínica y curación mucosa en la EC (32). Finalmente, se ha estudiado la relación de la EII con otros factores como geográficos, de contaminación, estrés y otros problemas psicológicos (33).

(iii) Microbiota intestinal. La microbiota intestinal de los pacientes con EII presenta una menor biodiversidad y desequilibrio entre microorganismos potencialmente patogénicos y no patogénicos (34). En la EC se ha observado disminución de *Firmicutes* (35) y aumento de enterobacterias (36), mientras que en la CU se ha demostrado disminución de *Clostridium spp*, y aumento de *Escherichia coli*. Así mismo, se ha visto que la actividad de la EII puede responder a terapia antibiótica (37), principalmente en la reservoritis. Por otro lado, la respuesta serológica a la flora bacteriana en la EC tiene implicaciones clínicas. Así, los anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), los anticuerpos contra la membrana externa de porina C, los anticuerpos contra la flagelina clostridial y los

anticuerpos contra *Pseudomonas fluorescens* (12) se han asociado con la afectación de intestino delgado y con un patrón estenótico o perforante (38-40).

3.1.5 Diagnóstico.

Para establecer el diagnóstico deben excluirse específicamente infecciones por enterobacterias, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis*, y otras causas de inflamación intestinal como determinados fármacos, isquemia y radiación, así como linfoma.

3.1.5.1 Colitis ulcerosa

Para su diagnóstico se utiliza una combinación de datos clínicos, endoscópicos, histológicos y radiológicos integrados en los criterios de Lennard-Jones (41) que se muestran en la Tabla 1:

Criterios clínicos	Rectorragia, diarrea crónica (aunque 10% presenta estreñimiento), dolor abdominal, manifestaciones extraintestinales
Criterios radiológicos	Cambios mucosos: Mucosa granular, úlceras espiculares o en “botón de camisa”, pseudopólipos. Cambios del calibre: estrechamiento de la luz, acortamiento del colon, pérdida de haustración
Criterios endoscópicos	Mucosa eritematosa, granular, edematosa y/o friable; exudado o ulceraciones; hemorragia al roce o espontánea; pseudopólipos o pólipos; lesiones continuas y con afectación prácticamente constante de recto
Criterios anatómo-patológicos	<i>Mayores:</i> inflamación exclusiva de la mucosa, úlceras superficiales, distorsión de las criptas, microabscesos, depleción de células caliciformes. <i>Menores:</i> infiltrado inflamatorio crónico difuso, aumento de la vascularización mucosa, metaplasia de las células de Paneth, atrofia mucosa, hiperplasia linfoide

Tabla 1: Criterios de Lennard-Jones para el diagnóstico de la colitis ulcerosa

3.1.5.2 Enfermedad de Crohn.

Para el diagnóstico de la EC también se utilizan los criterios de Lennard-Jones para EC (41), que se muestran en la Tabla 2.

Criterios clínicos	Dolor abdominal recurrente, diarrea, pérdida de peso, masa abdominal, fiebre o febrícula, enfermedad perianal, fístulas, manifestaciones extra-intestinales
Criterios radiológicos	Úlceras aftoides, lineales o en “espina de rosal”, úlceras longitudinales, pólipos inflamatorios, edema de las válvulas conniventes, estenosis, dilatación, fístulas, asimetría de las lesiones.
Criterios endoscópicos	<i>Colon:</i> aftas, ulceraciones lineales profundas o serpiginosas, aspecto en empedrado, estenosis, orificios fistulosos, pseudopólipos y pólipos; lesiones característicamente segmentarias, de extensión variable con recto mayoritariamente preservado <i>Íleon:</i> aftas, úlceras, estenosis
Criterios anatómo-patológicos	<i>Mayores:</i> inflamación transmural, granulomas no caseificantes, agregados linfoides sin centro germinal <i>Menores:</i> inflamación discontinua, inflamación de la submucosa con arquitectura epitelial conservada, retención de moco con inflamación crónica, fisuras

Tabla 2: Criterios de Lennard-Jones para el diagnóstico de la enfermedad de Crohn

3.1.5.3 Limitaciones diagnósticas

El **diagnóstico** de las entidades comprendidas en la EII es complejo dado que no existen hasta el momento hallazgos patognomónicos, ni de ninguno de sus subtipos. Existen marcadores de laboratorio útiles en el diagnóstico como la calprotectina fecal, la proteína C reactiva plasmática y diferentes tipos de anticuerpos como los anti-citoplasma de neutrófilo p-ANCA (más frecuentes en CU) y los previamente nombrados ASCA. Sin embargo, la colonoscopia con toma de biopsias sigue siendo una pieza fundamental para el diagnóstico de la EII. Además, está descrito que un 10% de los pacientes etiquetados de EC o CU requieren un cambio de diagnóstico (EC a CU, o CU a EC) a lo largo de su evolución (42, 43), y en

ocasiones este cambio de diagnóstico puede afectar negativamente al pronóstico, como en el caso de la reconstrucción con un reservorio ileoanal en la EC (44).

Existen múltiples índices histológicos que buscan tanto la confirmación del diagnóstico de EII como su **estadificación** e incluso constituir un factor **pronóstico** (45). La mayor parte de ellos no están validados, su utilización en la práctica clínica es compleja, y los datos que sustentan su utilidad fuera del ámbito de la investigación son aún escasos. Por último, hasta 25% de los pacientes con CU pueden presentar **extensión proximal** de la misma, habiéndose identificado la edad al diagnóstico menor de 18 años y la residencia en Norte América como factores de riesgo (46). De hecho, la activación de iNOS en el segmento indemne parece predecir el riesgo de progresión proximal en los pacientes con CU (47).

3.1.6 Tratamiento.

El tratamiento de la EII (6, 48) se basa, en primer término, en la inducción de la remisión del brote agudo con mesalazina en la CU o corticoides en la CU y la EC; en ocasiones es necesario el uso de inmunosupresores o fármacos bloqueantes del factor de necrosis tumoral α (TNF α). Tras el control del brote se instaura un tratamiento de mantenimiento en la mayoría de los casos. La mesalazina es el primer escalón en la CU, y los inmunosupresores como la azatioprina, o los fármacos biológicos (bloqueantes de TNF α , bloqueantes de IL-12/IL-23, bloqueantes de la integrina $\alpha 4\beta 7$) en ambas entidades. La cirugía es una opción reservada para los casos refractarios al tratamiento médico o en caso de complicaciones como perforación, hemorragia, displasia epitelial o cáncer.

A pesar del incremento de las opciones terapéuticas observado en las últimas décadas, la eficacia del arsenal terapéutico actualmente disponible para la

EII es **subóptima**. No existe un tratamiento curativo de la enfermedad debido entre otros factores a que su etiopatogenia es compleja y no existe una causa única determinante (49). Por ello el estudio de las vías celulares y moleculares implicadas en los mecanismos que determinan y regulan la inflamación epitelial adquiere gran importancia. La creciente oferta de agentes farmacológicos que bloquean diferentes vías de inflamación, cuya utilización depende de la gravedad de los síntomas, las características de la enfermedad y del paciente así como de los tratamientos previos recibidos ha permitido un mejor control sintomático y una mejoría de la calidad de vida (50). A pesar de ello un porcentaje no desdeñable de pacientes no responde a los tratamientos, o pierde dicha respuesta a lo largo del tiempo (51). Una vez más, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas parece imprescindible.

3.1.7 Modelos animales de EII

Los modelos animales representan una valiosa herramienta para el estudio de la EII. En la Tabla 3 se muestran los principales modelos animales utilizados.

Inducción por tratamiento químico	Genéticos convencionales	Genéticos condicionales (ratón)	Espontáneos
Ratón o rata tratado con DSS oral, o TNBS por vía rectal	IL-10 ^{-/-} JAK3 ^{-/-} TGF- β ^{-/-}	EPI/TAK1 ^{-/-} CD4/TGF β ^{-/-} Myeloid/STAT3 ^{-/-}	Tití de mechón blanco

Tabla 3: Ejemplos de modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal

Ratón deficiente en IL-10

El modelo animal empleado en esta tesis fue desarrollado en 1993 cuando Kühn *et al* (52) generaron una mutación en el gen que codifica la IL-10 en una línea

de ratón. Sustituyeron un fragmento de 500 pares de bases del exón 1 por un codón de terminación y también introdujeron un codón de terminación en el exón 3 (IL10^{tm1Cgn}, IL10^{-/-}). A las 3 semanas de edad el ratón desarrolla inflamación en el ciego, colon ascendente y transversal, para posteriormente afectar al resto del colon y recto, y presenta características histológicas similares a las de la EC humana: inflamación discontinua y transmural, con un infiltrado inflamatorio en la lámina *propria* y submucosa, hiperplasia epitelial, depleción de mucina, abscesos crípticos, úlceras y engrosamiento de la pared intestinal. De hecho, puede considerarse como un modelo de enfermedad humana, ya que se ha descrito que mutaciones autosómicas recesivas asociadas a pérdida de función de IL-10 o de su receptor son suficientes para causar EC pediátrica grave, sin ningún desencadenante medioambiental aparente (53). Algunos animales presentan también inflamación de intestino delgado, y hasta el 60% de los mutantes presentan adenocarcinoma colorectal (54). Esta afectación puede ser corregida con la administración de IL-10 recombinante (55). La inflamación cólica aparece debido a que la IL-10 es una citocina inmunoreguladora esencial para la homeostasis intestinal, y su disminución condiciona una respuesta aberrante de células T CD4⁺ Th1-*like* y excesiva secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-12, IL-17 e IFN γ (56). Además, se ha visto que hay participación de células Th17 (57) por medio de IL-23; y también de IL-13 (58), y activación de NF- κ B por medio de TLR en las células inmunes de la mucosa (59), y además requiere de MyD88 (60) sobre todo a nivel de las células mononucleares (61). Para el desarrollo de colitis espontánea en los ratones IL-10^{-/-} son necesarias las bacterias intestinales, ya que la misma no aparece en condiciones libres de patógenos (62). Así mismo, el

tratamiento antibiótico puede prevenir o atenuar el desarrollo de colitis en ratones IL-10^{-/-} (63).

A continuación se muestra la Tabla 4 con la comparativa de los 3 modelos animales de EII más habitualmente empleados.

	IL-10 ^{-/-}	Administración de DSS	Administración de TNBS
Tiempo de instauración	Semanas	<7 días	<7 días
Requerimientos para lograr el modelo	Espontánea	Tratamiento	Tratamiento
Gravedad	Moderada	Grave	Variable (dosis)
Necesidad de sedación	No	No	Sí
Necesidad de microbiota	Sí, sino ausencia de colitis	Sí, sino muerte precoz	
Mecanismo de inflamación	Th1 y Th17	Th1	Th1 y Th17
Coste del modelo	Caro	Barato	Barato
Afectación	Continua	Variable	Variable

Tabla 4: Modelos animales de enfermedad inflamatoria intestinal humana más frecuentemente utilizados

3.1.8 Disfunción de barrera en la inflamación mucosa

Las alteraciones en la barrera intestinal y el aumento de la permeabilidad de la misma han sido observados en pacientes con EII y en sus familiares de primer grado (64), y parece relacionado, al menos en parte, con anomalías estructurales y funcionales en las **uniones estrechas y en las uniones adherentes**. En concreto, se ha observado una regulación a la baja de E-cadherina (65), p120-catenina y β -catenina (66, 67), así como de las denominadas claudinas

de sellado (68), de ocludina y de ZO-1 (69). De hecho, determinados polimorfismos del gen de E-cadherina se han asociado a susceptibilidad para el desarrollo de CU (70) y EC (71). Otro mecanismo de alteración de la función de barrera es la **alteración del tráfico de las proteínas de unión** desde el citoplasma a la membrana lateral (2, 72). Por último, la **disrupción del citoesqueleto de actina**, al cual se unen tanto las uniones estrechas como las adherentes se ha objetivado en cultivos celulares en monocapa expuestos a mediadores inflamatorios así como en muestras humanas de pacientes con inflamación (73).

Estas alteraciones confieren un incremento de la permeabilidad paracelular del epitelio que condiciona el paso de microorganismos y antígenos alimentarios a su través, que se ha evidenciado en biopsias de colon en el 83% de los pacientes con CU y en el 25% de los pacientes con EC (74). Así mismo, se ha evidenciado un aumento del ADN bacteriano y componentes estructurales de la pared como el lipopolisacárido (LPS) en sangre de pacientes con EII con respecto a controles, sugiriendo un aumento de la **translocación bacteriana** intestinal (75). Estos mecanismos, junto con una mayor adhesión de bacterias del lumen intestinal a la superficie mucosa en los pacientes con EII (76), facilitan el contacto de los microorganismos con el sistema inmune y la excesiva respuesta del mismo, contribuyendo a la aparición y la perpetuación de la enfermedad.

3.1.9 El sistema inmune asociado a la mucosa digestiva en la EII

El tubo digestivo está dotado de un amplio repertorio de células inmunes. En la **lámina propia** de la mucosa y en la submucosa – en especial en el intestino delgado y el colon - se localizan las células del sistema inmune innato y adaptativo, células B y T, células linfoides innatas, macrófagos, células dendríticas, mastocitos,

neutrófilos y eosinófilos; igualmente entre las **CEI** se encuentran en condiciones fisiológicas las células T intraepiteliales. Así mismo, en la **superficie mucosa** hay elevadas concentraciones de inmunoglobulina (Ig) A, sintetizada por las células plasmáticas de la lámina *propria* y la submucosa, y transportada a la luz intestinal a través de las células intestinales, y que ejerce una función protectora e inmunoreguladora fundamental (77). Este repertorio celular junto con otros componentes no celulares de la mucosa como la capa de mucina, los péptidos antimicrobianos o la mencionada Ig A permiten una relación comensal tolerogénica entre la microbiota luminal y el huésped, que puede desequilibrarse y generar una respuesta inflamatoria exacerbada en un fenómeno denominado “pérdida de tolerancia”, característico de la EII. La disfunción en la respuesta inmune innata y adaptativa contribuye a la inflamación intestinal aberrante y crónica en los pacientes con EII.

Inmunidad innata. Es aquella que es llevada a cabo de manera no específica, en los primeros minutos-horas, como defensa contra agentes patógenos por las propias células epiteliales intestinales, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos y células *Natural Killer* (78). Se inicia con el reconocimiento de componentes de bacterias y virus patógenos (patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPS) por los *Toll-like Receptors* (TLR), proteínas de membrana presentes en las células epiteliales y las células inmunes del colon, y consecuentemente activan una vía proinflamatoria (79) que se muestra en la Figura 3, y que es compartida por la activación del receptor de IL-1 β (80).

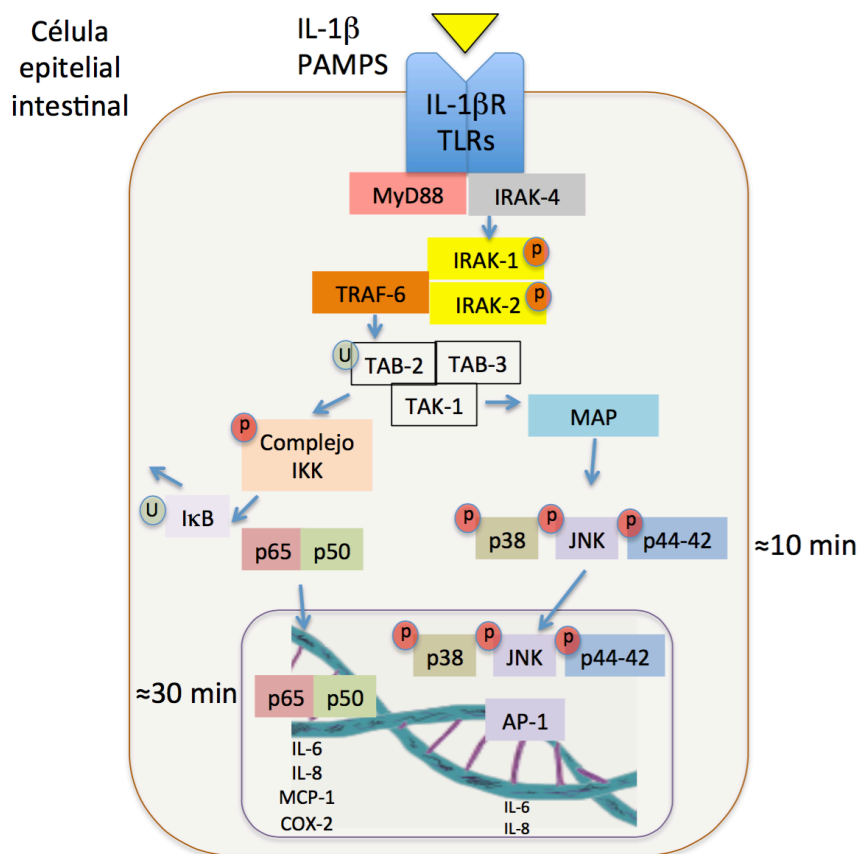


Figura 3: Vía de señalización de IL-1 β y TLR en la célula epitelial intestinal. Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o la IL-1 β se unen a su receptor, lo que da lugar a un cambio conformacional que en última instancia permite el reclutamiento de dos proteínas intracelulares, el gen de respuesta 88 para la diferenciación mieloide primaria (MyD88) y la protein-quinasa 4 activada por el receptor de IL-1 (IRAK-4). IRAK-4 permite la fosforilación de IRAK-1 y 2 lo cual conlleva el reclutamiento y la unión con el factor 6 asociado a TNF (TRAF-6) y este añade cadenas de ubiquitina a la protein-quinasa 1 activada por TGF- β (TAK-1) y a las proteínas 2 y 3 de unión a TAK-1 (TAB2 y 3). A este nivel se activan dos vías importantes de señalización. La adición de cadenas de ubiquitina activa al complejo de la quinasa inhibidora del factor nuclear B (IKK) que fosforila y promueve a su vez la ubiquitinación del inhibidor del factor nuclear B alfa (I κ B α) que lo degrada. Esto permite la liberación de las subunidades p50 y p65 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa en las células B (NF- κ B) y su traslocación al núcleo para unirse a áreas de respuesta de determinados genes como IL-6, IL-8, la proteína de quimioatracción de monocitos 1 (MCP-1) y ciclooxigenasa 2 (COX-2). Este paso al núcleo ocurre aproximadamente a los 30 minutos del inicio de la ruta. Por otro lado, la activación de TAK-1 activa las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAP) que fosforilan y activan p38, la quinasa del extremo N-terminal de c-Jun (JNK) y p44-42 (también conocida como quinasa regulada por señales extracelulares [ERK]), proceso que ocurre aproximadamente tras 10 minutos de la unión de IL-1 β a su receptor. JNK participa por medio de la fosforilación de AP-1 en la expresión de IL-6 e IL-8. P38 y ERK tienen funciones de control translacional y estabilización de ARNm.

En el colon de los pacientes con EC y CU se ha demostrado un aumento de la expresión de TLR4 (81). De hecho, uno de los PAMPs que se une al TLR es el LPS, compuesto encontrado en la superficie de las bacterias Gram negativas, y se ha visto que la proteína de unión a LPS detectada en sangre es un marcador de la

actividad en los pacientes con EC (82). Por otro lado, la autofagia, un proceso clave en la inmunidad innata y adaptativa que consiste en la degradación de patógenos citoplasmáticos y componentes celulares (83) puede tener un papel patogénico en la EC. Se ha visto que la disfunción de las células de Paneth, condición que puede dar lugar a la EC (84), está relacionada con la autofagia (85, 86).

Inmunidad adaptativa. Es altamente específica, y puede tardar varios días en actuar. La excesiva respuesta Th1 inducida por IL-12 se propone como la causa de la inflamación intestinal en la EC, mientras que en la CU la inflamación parece mediada por una respuesta Th2 con secreción de IL-4, IL-5 e IL-13, si bien esta afirmación no está claramente demostrada y resulta excesivamente simplista. Por otro lado, existen otro subtipo de células T llamado Th17, que son inducidas por IL-6 y *transforming growth factor* β (TGF- β), y que se expanden en respuesta a IL-23, produciendo grandes cantidades de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (87). La IL-17A está involucrada en la inflamación intestinal en pacientes con EII (88).

En la Figura 4 se muestra un esquema de la respuesta inmune en el epitelio intestinal en situación de homeostasis y de inflamación.

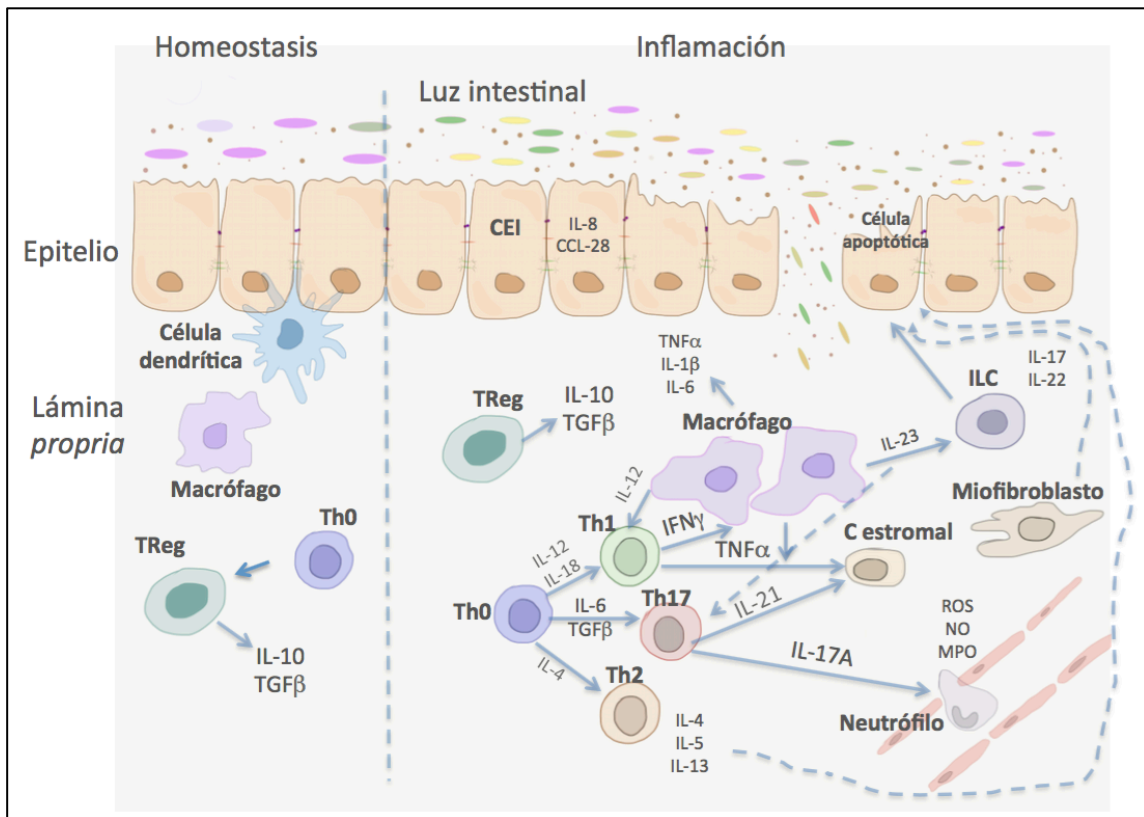


Figura 4: El sistema inmune innato y adaptativo en el epitelio intestinal en condiciones de inflamación y homeostasis. En ausencia de inflamación las células dendríticas y los macrófagos no se encuentran activados, y las células Th0 se diferencian en células T reguladoras que producen IL-10 y TGF-β. En condiciones de inflamación los macrófagos reconocen antígenos bacterianos por medio de los receptores *Toll-like* y producen IL-1, IL-6 y TNFα. Las células Th0 se diferencian menos en células T reguladoras y más hacia células Th1, Th2 y Th17, que estimulan la quimiotaxis, la apoptosis de células epiteliales y la degeneración neoplásica mediada por las células estromales y en concreto por las señales paracrinas de los miofibroblastos.

3.1.9.1 Citocinas y quimiocinas en la EII

Las citocinas y quimiocinas median en la comunicación intercelular, mantienen la homeostasis, permiten la defensa anti-microbiana y participan en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, pero cuando su activación es excesiva pueden precipitar la inflamación intestinal y el daño secundario a la misma (89). La Tabla 5 muestra las citocinas y quimiocinas con relevancia en la EII.

Nombre y función	Fuente celular	Función en EII	Ref
TNF- α Citocina pro-inflam	Monocitos, macrófagos, células epiteliales, mastocitos, linfocitos B y T, células natural killer, neutrófilos, células endoteliales, fibroblastos	Aumenta la expresión de otras citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 e IL-33, activa a los leucocitos, induce la secreción de reactantes de fase aguda y metaloproteinasas e inhibe la apoptosis de células inflamatorias. Su bloqueo es un tratamiento de la EII	(90) (91) (92)
IL-6 Citocina pro-inflam	Monocitos, macrófagos y linfocitos T y B activados	Activa STAT3, y estimula a las células presentadoras de antígeno y células T. Está aumentada en la lámina <i>propria</i> del colon de pacientes con EII y en modelos animales de colitis	(93)
IL-1 Citocina pro-inflam	Células dendríticas y macrófagos de la lámina <i>propria</i>	Promueve la inflamación de la mucosa del colon	(94)
IL-17 Citocina pro-inflam	Células linfoides innatas tipo 3 (ILC3), células Th17	Está aumentada en la mucosa inflamada de los pacientes con CU y EC. El bloqueo de su producción (IL-23) es un tratamiento de la EII	(95) (96)
IL-10 Citocina anti-inflam	Macrófagos, células dendríticas, células T reguladoras	Permite la homeostasis intestinal manteniendo un fenotipo anérgico de macrófagos y células dendríticas, y permite la tolerancia inmunológica. Mutaciones en IL-10 y su receptor dan lugar a EII de aparición muy temprana	(97) (98) (99)
TGF- β Citocina anti-inflam	Linfocitos, macrófagos, células endoteliales, plaquetas	Estimula la compensación epitelial y la fibrosis, e induce la tolerancia y la homeostasis. Reduce la expresión de IL-33. Sus niveles están aumentados en las células mononucleares de la lámina <i>propria</i> en pacientes con CU aunque disminuidos en EC	(100) (101)
IL-8 Quimiocina pro-inflam	Monocitos, macrófagos, células dendríticas, fibroblasto, célula endotelial	Induce la migración de neutrófilos y linfocitos T desde la sangre periférica hasta el tejido inflamado. Está aumentada en el colon de los pacientes con CU. Las células epiteliales intestinales en cultivo secretan IL-8 cuando son estimuladas con IL-1 β	(102) (103)
CCL-28 Quimiocina pro-inflam	CEI del colon, intestino delgado, pulmón, tráquea, mama y glándulas salivales	Regula la quimiotaxis de las células CD4 y CD8+. Su expresión en biopsias de colon de pacientes con CU se ha visto aumentada, así como en injertos heterólogos de colon y cultivos celulares de CEI de colon tras estimularlos con IL-1 α	(104)

Tabla 5: Citocinas y quimiocinas con relevancia en el epitelio intestinal de la EII. Abreviaturas: TNF α : factor de necrosis tumoral alfa; IL: interleucina; TGF β : factor de crecimiento transformante β ; CCL-28: C-C motif ligando 28.

3.2 Receptor hepático X

3.2.1 Receptores nucleares

Los receptores nucleares (RN) son proteínas que modulan la transcripción de determinados genes diana (105) implicados en la proliferación, diferenciación y homeostasis celular. Se han descrito 48 subtipos de RN en el humano (106). En la Tabla 6 se muestran los RN más relevantes, sus ligandos biológicos y la evidencia existente sobre su papel en la EII.

Receptor	Ligando	Evidencia en EII
Receptor del ácido retinoico (RAR) α , β , γ	Ácido transretinoico, isotretinoína, etretinato, acitretina	La vitamina A inhibe el desarrollo de colitis por DSS en ratones y ratas, así como la aparición de cáncer de colon (107, 108).
Receptor retinoico X (RXR) α , β , γ	Ácido transretinoico 9- <i>cis</i> , bexaroteno	Los ratones <i>Rxra</i> ^{+/-} son muy sensibles al TNBS y al DSS como modelo de colitis (109). La activación de RXR con un ligando disminuye la inflamación intestinal del modelo de TNBS, y este efecto parece sinérgico al del agonista de PPAR γ (110).
Receptor de hormona tiroidea (TR)	Hormona tiroidea	Desconocido
Receptor de vitamina D3 (VDR)	Vitamina D, calcitriol	La vitamina D tiene un efecto protector en los pacientes con EII (111, 112). La expresión del VDR también protege contra la colitis en un modelo animal (113).
Receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR) α , β , γ	Ácidos grasos, fibratos, leucotrieno B ₄ , tiazolidindionas	PPAR γ está disminuido en las CEI de pacientes con CU (114). El agonista de PPAR γ condiciona efectos anti-inflamatorios en células Caco-2 y en modelos animales experimentales (115). Su administración en humanos también ha mostrado beneficio clínico (116). PPAR γ es una de las vías efectoras anti-inflamatorias de 5-ASA (117).
Receptor X de pregnano	Xenobioticos, rifaximina	El tratamiento con rifaximina tiene beneficio clínico en los pacientes con EII (118). En modelos de laboratorio se ha demostrado un efecto anti-inflamatorio y preservador de barrera intestinal de los agonistas de PXR (119, 120).
Receptor hepático X α , β (LXR)	Oxisteroles	Se detalla más adelante.
Receptor de estrógenos α , β	Estradiol	Su expresión está disminuida en la mucosa de colon de pacientes con EII. 17- β estradiol tienen efecto anti-inflamatorio en modelos murinos de colitis (121).

Receptor de progesterona	Progesterona	Desconocido
Receptor de glucocorticoides	Cortisol, corticosteroides	Los glucocorticoides permiten inducir la remisión clínica en pacientes con EII (122).
Receptor de mineralcorticoides	Aldosterona, espironolactona	Desconocido
Receptor farnesoide X (FXR)	Ácido quenodeoxicólico, cólico, deoxicólico, litocólico.	Los ratones deficientes en FXR son más susceptibles al DSS o TNBS como modelo de colitis (123). La expresión epitelial de moléculas pro-inflamatorias disminuyó al activar FXR (124). Hay una reducción del RNAm de FXR en el colon inflamado de pacientes con EC y en modelos murinos de colitis (123).
Receptor de andrógenos	Testosterona	Los niveles de testosterona en mujeres previos al diagnóstico disminuyen el riesgo de EC pero no de CU (125).

Tabla 6: Receptores nucleares, sus ligandos endógenos conocidos, y las evidencias de su implicación en la EII.

3.2.2 Descripción y mecanismo de acción de LXR

El receptor hepático X (*liver X receptor*, LXR) es un miembro de la familia de los RN descubierto en 1994 en el hígado de rata (126). Pertenece a la subfamilia de receptores nucleares huérfanos “adoptados” tras el descubrimiento en 1995 de un ligando endógeno, los oxisteroles (127). Se han descrito dos isoformas: LXR α o NR1H3 (*nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3*, localizado en el cromosoma 11p11.2) y LXR β o NR1H2 (*nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2*, localizado en el cromosoma 19q13.3). En el humano ambas isoformas comparten casi el 80% de la secuencia de aminoácidos de su dominio de unión al ADN y de su dominio de unión al ligando (128) por lo que responden a los mismos ligandos (129), pero presentan expresión diferente dependiendo del tejido estudiado. LXR α se expresa en el hígado, intestino, tejido adiposo y macrófagos, mientras que LXR β es prácticamente ubicuo (130), sobre todo está presente en el sistema inmune, vesícula biliar, islotes pancreáticos, tejido muscular esquelético y

epitelio prostático (131). El mecanismo de acción de LXR se muestra en la Figura 5 (132, 133).

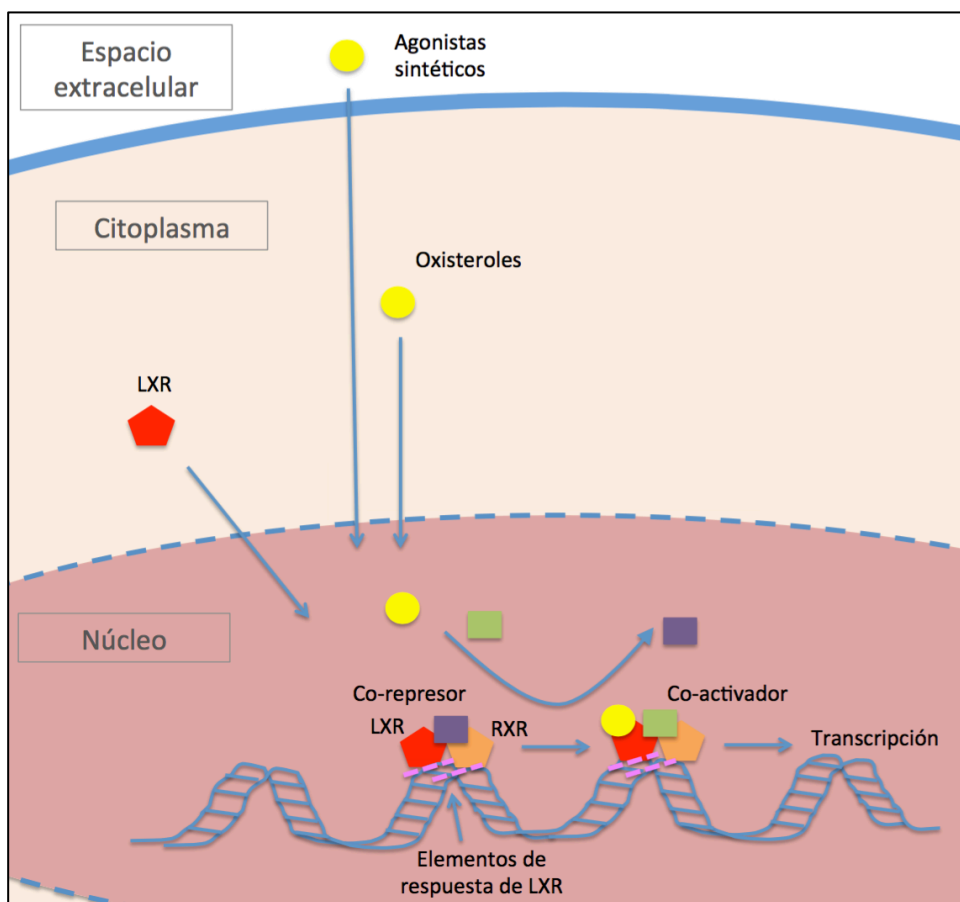


Figura 5: Mecanismo de acción de LXR. La llegada de un agonista ya sea sintético (GW3965) o endógeno (oxisteroles) permite su unión a LXR en el núcleo, donde se encuentra formando heterodímeros junto al receptor retinoide X (RXR), unidos a los elementos de respuesta de LXR y bloqueados por un complejo co-represor. El agonista permite la liberación del complejo co-represor y unión del complejo co-activador que permite el inicio de la actividad transcripcional.

3.2.3 Ligandos endógenos y agonistas sintéticos de LXR

Los ligandos endógenos de LXR son los denominados oxisteroles (127), que son derivados oxidados del colesterol entre los que se incluyen 22(R)-hidroxicolesterol, 24(S)-hidroxicolesterol, 24(S),25-epoxicolesterol, 20(S)-hidroxicolesterol, y 27-hidroxicolesterol. Sin embargo el propio colesterol no es un ligando de LXR. También se han descrito otros agonistas naturales de LXR α y β como la glucosa a concentraciones elevadas (134) y los fitosteroles (135); así como

otros agonistas selectivos tales como un subtipo de ácidos biliares para LXR α (136), y N-aciltiadiazolinas para LXR β (137). Además, se han comercializado ligandos sintéticos de LXR como GW3965 (138), T0901317 (139), DMHCA (140) y un agonista específico de LXR a nivel intestinal, GW6340 (141).

3.2.4 Funciones de LXR.

LXR modula la transcripción de sus genes diana uniéndose a los denominados elementos de respuesta de LXR, y los cambios en la transcripción determinan sus diferentes funciones.

3.2.4.1 LXR en el metabolismo lipídico.

El colesterol es un precursor de las hormonas esteroideas, ácidos biliares y vitamina D; también es un componente esencial de las membranas celulares (142) y se relaciona con su permeabilidad. La homeostasis de colesterol se mantiene gracias a un cuidadoso equilibrio entre su transporte, síntesis, absorción y eliminación. Dos tercios del colesterol plasmático se transportan en las denominadas lipoproteínas de baja densidad (*low-density lipoprotein*, LDL), mientras que un tercio del colesterol es captado desde los tejidos periféricos por las lipoproteínas de alta densidad (*high-density lipoprotein*, HDL) que a su vez es transportado hasta el hígado para su excreción biliar, proceso que se denomina transporte reverso de colesterol. En la Tabla 7 se muestran los genes diana de LXR implicados en el metabolismo del colesterol y sus funciones sobre el mismo:










Gen diana, y acción de LXR sobre su expresión	Función	Referencia
ABCA1 	Media el transporte de fosfolípidos y colesterol a apolipoproteínas pobres en lípidos como Apo-A1, que estabiliza la partícula de HDL y aumenta sus niveles plasmáticos	(143)
ABCG1 	Responsable junto con ABCA1 del flujo del colesterol celular hacia el HDL	(144)
Apo-E 	Promueve el flujo lipídico hacia el exterior celular y su incorporación a partículas de HDL pobres en lípidos	(145)
PLTP 	Facilita el paso de fosfolípidos desde las lipoproteínas ApoB a HDL	(146)
UGT1A3 	Enzima esencial en la glucuronidación de los ácidos biliares que favorece su excreción urinaria	(147)
ABCG5/ ABCG8 	Presentes en la membrana apical de los enterocitos promoviendo la excreción trans-intestinal de colesterol y también en la membrana canalicular de los hepatocitos favoreciendo su excreción biliar	(148, 149)
NPC1L1 	Transportador presente en la membrana en cepillo de los enterocitos y necesario para la absorción intestinal de colesterol	(150)
FAS 	Lipogénesis, hígado graso e hipertrigliceridemia	(151)
SREBP1c 	Lipogénesis, hígado graso e hipertrigliceridemia	(139)

Tabla 7: Genes diana de LXR implicados en el metabolismo lipídico. El efecto de la estimulación de LXR sobre cada gen diana se muestra como una flecha verde apuntando hacia arriba (aumento de la expresión del gen) o una flecha roja hacia abajo (disminución de la expresión). Abreviaturas: ABCA1: transportador dependiente de ATP A1; ABCG1, 5, 8: transportador dependiente de ATP G1, 5, 8; PLTP: proteína de transferencia de fosfolípidos; UGT1A3: UDP glucuronosiltransferasa 1-3; FAS: sintasa de ácidos grasos; SREBP 1c: proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1c

LXR participa en el **transporte reverso de colesterol**, tanto en el macrófago como en el epitelio intestinal, donde ABCA1 es una pieza clave (152). De hecho hay estudios (141, 153, 154) que sugieren que la activación intestinal de LXR puede ser la pieza fundamental de dicho transporte.

3.2.4.2 LXR en el metabolismo de la glucosa

La activación de LXR mejora los niveles de glucosa en ratones diabéticos (155), y parece que dichos efectos se deben a la supresión de la gluconeogénesis hepática y a una mejoría de la sensibilidad a la insulina (156-158) .

3.2.4.3 LXR y cáncer

Se ha demostrado que LXR se expresa en células cancerígenas, y que interviene en la proliferación y muerte celular. La activación de LXR redujo la proliferación de varias líneas celulares de cáncer de mama (159) y de próstata (160), probablemente mediada por el aumento de expresión de p27 y estabilización de las células en la fase G1 del ciclo celular, así como por el bloqueo de la ruta AKT (161). En células de cáncer de colon la activación de LXR ha demostrado inhibir la proliferación modulando la expresión de reguladores del ciclo celular (162), inhibiendo la actividad oncogénica de la β -catenina (163), y por piroptosis mediada por la activación de caspasa-1, efecto no transcripcional de LXR β (164).

3.2.4.4 LXR e inflamación

El estudio de LXR en un contexto de inflamación se ha llevado a cabo fundamentalmente en el **macrófago**, mientras que apenas ha sido estudiado en la

CEI. La activación de LXR **bloquea la inducción de proteínas inflamatorias** como la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS), la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la IL-6 y la metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9) en macrófagos en respuesta LPS, TNF α e IL-1 β (165, 166), antagonizando la ruta inflamatoria de NF- κ B. Esta inhibición es menor en macrófagos de ratones deficientes en LXR α y LXR β , y desaparece en los deficientes en LXR $\alpha\beta$. Por otro lado LXR parece **interaccionar con los TLR**. Se ha visto que componentes bacterianos o virales bloquean la expresión de los genes diana de LXR en macrófagos por la activación de TLR3 y TLR4 (167, 168), proceso mediado por un efector de ambos TLR, IRF3, independiente de la vía MyD88 y NF- κ B. Este bloqueo también se observó *in vivo* en ratones tratados con un agonista de LXR, GW3965, tras recibir poli I:C intraperitoneal, una doble cadena de ARN que se une a TLR3. Por lo tanto, la comunicación recíproca entre TLR y LXR condiciona que durante la infección la excreción de colesterol esté disminuida, lo cual podría ser una de las causas de la colestasis observada frecuentemente en la sepsis. LXR también promueve la expresión de moléculas anti-inflamatorias como la arginasa II (169), que cataliza la L-arginina evitando así su unión a iNOS.

Hay varios estudios que demuestran que los agonistas de LXR mejoran la inflamación en modelos *in vivo*. En un modelo de dermatitis irritante por contacto los ratones tratados con GW3965 o T0901317 presentaron mejor evolución clínica e histológica (166). Lo mismo ocurrió cuando al mismo modelo se le aplicó oxisteroles (170).

3.2.4.5 LXR y enfermedad inflamatoria intestinal

El **papel anti-inflamatorio** de los receptores LXR en un modelo animal de EII ha sido estudiado por Jakobsson *et al* (171), quienes observaron una peor evolución de peso, sangrado rectal y diarrea, así como un mayor patrón inflamatorio en el colon de ratones deficientes para LXR (sobre todo los ratones LXR $\beta^{-/-}$ y LXR $\alpha\beta^{-/-}$) comparado con los ratones salvajes tras aplicarles DSS en el agua de bebida o por TNBS por vía rectal. También observaron que la administración de GW3965 los 4 días previos al agente químico conllevó una recuperación más rápida del peso, y una menor respuesta inflamatoria en el colon, hallazgo que se confirmó también en el modelo de administración de LPS peritoneal. Dicho efecto anti-inflamatorio del GW3965 se perdía en ratones sin expresión de la isoforma LXR β . En células epiteliales en cultivo se pudo demostrar que el pre-tratamiento con GW3965 disminuyó la expresión génica de marcadores inflamatorios tras la incubación con TNF α , y TNF α junto con LPS, efecto que desaparecía al disminuir la expresión de LXR β . Finalmente se objetivó que la expresión de LXR α y LXR β por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) en biopsias de colon de pacientes con EII era menor que en pacientes control. Otro estudio reciente (172) también observó una menor pérdida de peso, un menor patrón inflamatorio en el examen histológico y una menor expresión de genes pro-inflamatorios en el colon de los ratones pre-tratados con agonistas de LXR - DMHCA y T0901317 – antes de la administración de DSS, comparados con vehículo. Llamativamente, la relación existente entre LXR y la **función de barrera** fue valorada en un estudio que observó que la delección específica en el intestino del gen de FAS produjo una disminución en la capa de

moco, un incremento en la permeabilidad intestinal, colitis e inflamación sistémica acompañados de cambios en la microbiota intestinal (173).

Por último, los **oxisteroles**, agonistas endógenos de LXR, se encuentran alterados en el colon, la sangre y el hígado de los ratones tratados con DSS o TNBS (174). El 4β hidroxicolesterol y 25 hidroxicolesterol estaban aumentados en el colon de los animales, mientras que 7α hidroxicolesterol-*none* y 25 hidroxicolesterol estaban elevados en las biopsias de pacientes con EII. La administración de 4β hidroxicolesterol a ratones del modelo de DSS condicionó aumento de la expresión de marcadores de inflamación, mientras que la administración de 25 hidroxicolesterol no tuvo ningún efecto.

El papel de los receptores LXR y sus genes diana (ABCA1 y FAS) no ha sido estudiado en otros modelos de EII como el ratón IL-10^{-/-} o en la EII humana.

3.2.4.6 Relevancia de ABCA1 en el efecto de LXR sobre la cascada inflamatoria y sobre la proliferación observada en el cáncer

Las CEI captan moléculas de colesterol, que son oxidadas y activan a LXR induciendo la expresión de ABCA1, una proteína de membrana cuya función es mediar el transporte de colesterol, fosfolípidos y otras moléculas lipofílicas a través de la membrana celular donde son aceptadas por las HDL (175).

Es importante comentar que estudios en **macrófagos** han mostrado el **papel anti-inflamatorio** de ABCA1. Los macrófagos aislados de ratones deficientes en ABCA1 presentan mayores niveles de IL-1 β y TNF α que los controles salvajes y los deficientes en LDL, y el aumento de IL-1 β , TNF α , IL-6 e IFN γ tras administrar LPS intraperitoneal fue mayor (176). Este efecto está mediado por la ruta de NF- κ B y MAP quinasas (177). Ito *et al* demostraron que los

macrófagos deficientes en ABCA1 no presentaban la reducción de citocinas pro-inflamatorias conseguida con un agonista de LXR, la cual está mediada por vías de señalización dependientes de TLR4, concretamente p44-42 MAP quinasas, p38, JNK MAP quinasas y NF- κ B (178), y este efecto es dependiente de LXR y de ABCA1. El estudio *in vivo* mostró que la administración de un agonista de LXR a ratones ABCA1^{-/-} estimulados con LPS redujo en menor medida la expresión de genes pro-inflamatorios con respecto a ratones salvajes tratados con el agonista.

El mecanismo del efecto anti-inflamatorio de ABCA1 parece mediado al menos en parte por su capacidad de modular el contenido de colesterol de las llamadas **balsas lipídicas** (*lipid rafts*). Estas son microdominios de membrana enriquecidos con colesterol y esfingolípidos que participan en el tráfico transmembrana, en procesos inmunológicos y neuronales de membrana, en la adhesión celular, así como punto de unión para receptores de microorganismos (179). La cantidad de colesterol de las balsas lipídicas tiene gran importancia en los procesos inflamatorios. Un estudio en macrófagos alveolares relacionó la disminución de moléculas pro-inflamatorias con la disminución de colesterol en las balsas lipídicas y un menor paso de TLR4 a los mismos, efecto que se perdía cuando se silenció LXR α (180). La activación de LXR redujo la cantidad de colesterol de las balsas lipídicas en macrófagos salvajes y no en macrófagos deficientes en LXR ni en deficientes en ABCA1 (178). También, el reclutamiento de MyD88 y TRAF6 por las balsas lipídicas tras la estimulación con LPS se redujo con la activación de LXR, y este efecto se perdía en macrófagos deficientes en ABCA1, que además presentaban un aumento de las balsas lipídicas(181). La depleción de colesterol en estos macrófagos también consiguió reducir la secreción de citocinas pro-inflamatorias (177). En un estudio de daño pulmonar agudo la administración

de platicodina D en células epiteliales pulmonares estimuladas con LPS tuvo un efecto anti-inflamatorio mediado por LXR α , que condiciona disminución del colesterol de las balsas lipídicas y menor reclutamiento de TLR4 por los mismos (182). Finalmente, los macrófagos deficientes en ABCA1 tenían una mayor cantidad de colesterol libre en las balsas lipídicas, y presentaban un mayor tráfico de TLR4 hacia los mismos de manera espontánea y tras estimularlos con LPS comparado con macrófagos salvajes (183). Por otro lado, ABCA1 puede interaccionar con la apolipoproteína A1 (apoA-1), y así disminuir la producción de citocinas pro-inflamatorias, lo cual puede estar mediado por STAT3 (184). Por tanto, ABCA1 podría ser explorada como diana terapéutica en enfermedades de base inflamatoria mediada por macrófagos como la EII (185).

Por último, parece existir también una **comunicación cruzada** por la cual la expresión de ABCA1 disminuye en respuesta a moléculas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF α , hecho observado en CEI en cultivo, así como macrófagos y células epiteliales pulmonares (168, 186, 187). No queda claro si este efecto está mediado por LXR.

Finalmente, el **efecto anti-proliferativo** de LXR observado previamente podría estar relacionado también con las balsas lipídicas por medio de la proteína quinasa AKT, una quinasa de vía oncogénica. Se ha demostrado que cambios en el contenido del colesterol de las membranas tras administrar un agonista de LXR condicionan una disrupción de las balsas lipídicas, disminución de la actividad de la vía de AKT y con ello la reactivación de la apoptosis (161, 188). Los autores relacionan el efecto con ABCG1, si bien ABCA1 podría ser también responsable.

Este efecto anti-inflamatorio y anti-proliferativo de ABCA1 no ha sido evaluado en la CEI.

4 HIPÓTESIS

4.1 JUSTIFICACIÓN

La enfermedad inflamatoria intestinal constituye un importante y creciente problema sanitario. Su etiopatogenia no es del todo conocida, y no existen marcadores específicos para su diagnóstico, ni para el de sus subtipos más importantes, la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. La presencia de una respuesta inflamatoria inapropiada es crítica en su patogenia. Por tanto, no es sorprendente que su tratamiento esté esencialmente dirigido al bloqueo de la cascada inflamatoria. No obstante, la terapia médica actual no es siempre efectiva y sus efectos secundarios pueden ser potencialmente graves.

Sin duda, el conocimiento preciso de los mecanismos asociados a la presencia de la respuesta inflamatoria inapropiada, característica esencial de la EII, es crítico para una mejor comprensión de la enfermedad y especialmente, para la identificación de potenciales tratamientos. En este sentido, la valoración de la implicación del receptor nuclear LXR, partícipe de la regulación de la cascada de respuesta inflamatoria pudiera arrojar luz sobre algunos de estos aspectos aún desconocidos en la EII.

Por otra parte, la modulación farmacológica de LXR, con un demostrado potencial anti-inflamatorio en estudios previos en el macrófago (178), puede asimismo constituir una diana adicional para el tratamiento de la EII.

Llamativamente, el efecto anti-inflamatorio asociado a la modulación de LXR no ha sido estudiado en el epitelio intestinal; por otra parte el análisis de este potencial efecto terapéutico en modelos animales agresivos de EII (171) puede no reflejar apropiadamente la enfermedad humana y por tanto, limitar la capacidad

traslacional de los efectos observados. Por lo tanto, la presente tesis pretende evaluar, desde una perspectiva claramente traslacional, el papel de LXR en la EII a partir de una triple aproximación: valoración en cultivos celulares de epitelio ileocólico, en ratones genéticamente modificados que desarrollan ileocolitis crónica con notables similitudes con la enfermedad humana, y en biopsias endoscópicas de colon.

4.2 HIPOTESIS GENERAL

La vía de señalización LXR-ABCA1 tiene un papel anti-inflamatorio en el epitelio del colon, y la expresión epitelial de LXR puede estar modificada en la EII.

4.3 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- El porcentaje de núcleos positivos para LXR en el epitelio intestinal tiene capacidad diagnóstica o pronóstica en sujetos con EII.
- La estimulación de LXR con el agonista específico GW3965 reduce la respuesta inflamatoria inducida por la IL-1 β en el epitelio intestinal.

5 OBJETIVOS

5.1 Principal

Determinar la capacidad diagnóstica y potencial efecto anti-inflamatorio de la ruta LXR-ABCA1 en el epitelio intestinal del colon en la EII.

5.2 Específicos

- 1) Valorar el impacto diagnóstico y pronóstico de los cambios de LXR en la mucosa de colon en una cohorte de pacientes con EII en sus tres subtipos principales (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y colitis inclasificable).
- 2) Analizar la expresión génica y proteica de LXR y sus genes diana en el colon del ratón deficiente en IL-10.
- 3) Estudiar el efecto de un estímulo inflamatorio sobre el epitelio intestinal en cultivo celular, sobre la expresión de LXR, sus genes diana y quimiocinas.
- 4) Estudiar el efecto de la estimulación farmacológica de LXR sobre el epitelio intestinal.
- 5) Valorar el efecto de la administración de un agonista farmacológico de LXR sobre la expresión de quimiocinas de secreción de células epiteliales intestinales en condiciones *in vitro* de inflamación epitelial, y así validar en la célula epitelial intestinal los datos existentes en el macrófago.
- 6) Identificar el mecanismo del efecto anti-inflamatorio del agonista de LXR en cultivos de células Caco-2 en condiciones inflamatorias.
- 7) Determinar el papel mediador de ABCA1 sobre el efecto anti-inflamatorio y anti-proliferativo del agonista de LXR.

6 PACIENTES, MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Consideraciones generales.

El presente proyecto se ha desarrollado en las instalaciones pertenecientes al Hospital General Universitario Gregorio Marañón y al Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Gregorio Marañón (IiSGM) y con la participación de:

(i). Servicio de Aparato Digestivo incluyendo a la Sección de Endoscopia Digestiva, que cuenta con la acreditación según la norma ISO 2001:9008 para la realización de pruebas diagnósticas, terapéuticas y funcionales del aparato digestivo.

(ii). Animalario y Laboratorio de investigación en Hepatología y Gastroenterología, perteneciente al IiSGM y la Universidad Complutense de Madrid, que cuenta con financiación del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD).

(iii). Departamento de Anatomía Patológica.

Los procedimientos empleados para la obtención, procesamiento y uso de las muestras de origen humano y animal fueron evaluados y autorizados por el Comité de Ética de Investigación Clínica del área 1, del HGUGM (CEIC-A1).

6.2 Materiales.

6.2.1 Reactivos, soluciones y tampones.

En las Tablas 8 y 9 se muestran las soluciones y los productos de uso general en el laboratorio, respectivamente:

Solución	Composición
PBS 10x	9 L de agua destilada 80 g NaCl 2 g KCl 6,1 g Na ₂ HPO ₄ 2 g KH ₂ PO ₄ Rellenar hasta un volumen total 10 L con agua destilada Ajustar a pH 7,4
PBS-Tween	Añadir Tween al 1/1000 a PBS
TBS 10x	5 L de agua destilada 96,9 g TRIS Base 701,3 g NaCl Rellenar hasta un volumen total 8 L con agua destilada Autoclavar
TBS-Tween	Añadir Tween a TBS 1x al 1/1000

Tabla 8: Soluciones de uso general utilizadas y sus componentes

Agente	Función	Marca comercial
DMSO-Dimetilsulfóxido	Criopreservante para la congelación de cultivos celulares	Life Technologies
Triton x-100	Detergente para solubilizar proteínas	Acros-Organics
Tween 20	Detergente para buffer de western blot, IHQ, qPCR	Sigma-Aldrich
TRIS base	Componente de diferentes buffer	Fisher Scientific

Tabla 9: Productos de uso general, función y marca comercial.

Se utilizaron los siguientes **reactivos**:

- *Agonista de LXR*. Se usó el GW3965 (Sigma-Aldrich) (171).
- *Antagonista de ABCA1*. Se utilizó la glibenclamida (Sigma-Aldrich).
- *Vehículo de ambos compuestos*. Se utilizó DMSO (Life Technologies).

6.2.2 Anticuerpos primarios

La Tabla 10 muestra un listado de los anticuerpos primarios utilizados:

Proteína	Especie que reconoce	Tipo	Animal huésped	Utilidad en este trabajo	Casa comercial	Referencia
LXR $\alpha\beta$	Humano, ratón, rata	Policlonal	Cabra	IHQ ratón	Imgenex	IMG-3380
LXR $\alpha\beta$	Humano	Monoclonal	Ratón	IHQ humano	Santa Cruz Biotechnology	sc-271064 (G-10)
LXR $\alpha\beta$	Humano	Monoclonal	Ratón	WB humano	Santa Cruz Biotechnology	Sc-377260 (H-7)
ABCA1	Humano, ratón, rata	Policlonal	Cabra	IHQ ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-5491
E-cadherina	Humano, ratón, perro	Monoclonal	Rata	IFI tejido ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-59778
GAPDH	Humano, ratón, otros	Monoclonal	Conejo	WB humano	Cell Signaling Technology	5174
LXR α	Humano, ratón, rata	Policlonal	Cabra	IHQ ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-1202
LXR β	Humano, ratón, rata	Policlonal	Cabra	IHQ ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-1203
NF κ B p65	Humano, ratón, rata	Policlonal	Conejo	IFI celular humano, IHQ ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-109
p44/42 MAPK	Humano, ratón, otros	Monoclonal	Ratón	WB humano	Cell Signaling Technology	9107
p44/42 MAPK fosforilada	Humano, ratón, otros	Policlonal	Conejo	WB humano	Cell Signaling Technology	9101
IL-8				ELISA	eBioscience	Ready-set-Go! 2nd Generation
AKT	Humano, ratón, rata	Monoclonal	Conejo	WB	Cell Signaling Technology	#4691
AKT fosforilada	Humano, ratón, rata	Monoclonal	Conejo	WB	Cell Signaling Technology	#4060

Tabla 10: Anticuerpos primarios utilizados.

6.2.3 Anticuerpos secundarios

Según la técnica utilizada se eligieron unos anticuerpos secundarios específicos.

- *Western blot*. Se usaron anticuerpos secundarios unidos a una peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP), enzima capaz de oxidar un sustrato y producir un derivado luminiscente.
- *Inmunohistoquímica*. Se utilizaron anticuerpos secundarios comercializados en el kit ABC (Vectastain).
- *Inmunofluorescencia indirecta celular y en tejidos*. Se utilizaron anticuerpos marcados por compuestos fluorescentes.
- *ELISA*. Se utilizó el anticuerpo secundario aportado en el kit Ready-set-Go! 2nd Generation (eBioscience).

Los anticuerpos secundarios comerciales se detallan en la Tabla 11:

Ig que reconoce	Especie huésped	Uso	Casa comercial	ID comercial
Ig G conejo	Burro	WB	Jackson ImmunoResearch	711-035-152
Ig G ratón	Burro	WB	Jackson ImmunoResearch	715-035-150
Ig G cabra	Burro	WB	Jackson ImmunoResearch	705-035-003
Ig G conejo	Burro	IFI	Jackson ImmunoResearch	711-546-152
Ig G ratón	Cabra	IFI	Jackson ImmunoResearch	115-195-146

Tabla 11: Anticuerpos secundarios utilizados.

6.2.4 Primers

En los experimentos que analizaron la expresión de moléculas en el extracto de ARNm por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) se

utilizaron los cebadores (*primers*) que se detallan en la Tabla 12 (humano) y 13 (ratón). Para su diseño se utilizó la siguiente herramienta online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Se realizó un test de *primers* con curvas de disociación o de Melting que aplica un gradiente creciente de temperatura para comprobar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. En el protocolo de anillamiento del termociclador se utilizó la temperatura que daba lugar a un producto más específico.

<i>Primers para humano</i>				
Gen	Secuencia (5'...3')	Proveedor	Temperatura anillamiento (°C)	Tamaño amplicón (pares bases)
LXR α	(F) ACCAGCTCCAGGTAGAGAGG (R) ACACAGCACAGTGTAGCGA	Invitrogen	55	426
LXR β	(F) GATGTCCCAGGCACTGATGA (R) AGCTGAGCACGTTGTAGTGG	Invitrogen	55	179
ABCA1	(F) ATGGCTTGTTGGCCTCAGC (R) GCAGCAGCTGACATGTTTGT	Invitrogen	55	79
CCL25	(F) CCAAGGTGTCTTTGAGGACTGCTCCC (R) GGGAGACATTCTGTTGCTGGTGCTG	Invitrogen	55	353
CCL28	(F) AGAAGCCATACTTCCCATTGC (R) AGCTTGCACTTTCATCCACTG	Invitrogen	50	208
Vilina	(F) CTAACAGCAACCTCAGTTCT (R) CCTACAATCAGGGTAGGGTA	Invitrogen	55	267
β -Actina	(F) AGGCACCAGGGGTGAT (R) GCCCACCATAGGAATCCTTCTGAC	Invitrogen	55	51
ZO-1	(F) CACAGAAGGCGGGCCTACAC (R) TGGAAGGAGCTGGGGTGGGCT	Invitrogen	65	267
IL-6	(F) CCACACAGACAGCCACTCACC (R) CTACATTTGCCGAAGAGCCCTC	Invitrogen	55	516
IL-8	(F) CTCTCTTGGCAGCCTTCCTGATT (R) AACTTCTCCACAACCCTCTGCAC	Invitrogen	55	253

Tabla 12: *Primers* utilizados para moléculas de origen humano, así como su secuencia, proveedor, temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón en pares de bases.

Primers para ratón				
Gen	Secuencia (5'...3')	Proveedor	Tª de anillam (°C)	Tamaño amplicón (pares de bases)
β-Actina	(F) CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT (R) CGTCACACTTCATGATGGAATTGA	Invitrogen	55	100
LXRα	(F) CCTTCCTCAAGGACTTCAGTTAGTTACAA (R) CATGGCTCTGGAGAACTCAAAGAT	Invitrogen	50	98
LXRβ	(F) CATTGCGACTCCAGGACAAGA (R) CCCAGATCTCGGACAGCAAG	Invitrogen	51,3	51
iNOS	(F) CAGCTGGGCTGTACAAACCTT (R) CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG	Invitrogen	55	95
TNFα	(F) ACGGCATGGATCTCAAAGAC (R) GTGGGTGAGGAGCACGTAGT	Invitrogen	55	116
IL1β	(F) TCACAGCAGCACATCAACAA (R) TGTCCCTCATCCTCGAAGGTC	Invitrogen	55	112
IL-6	(F) CCCCAATTTCCAATGCTCTCC (R) CGCACTAGGTTTGCCGAGTA	Invitrogen	50	141
E-Cadherina	(F) CAAAGTGACGCTGAAGTCCA (R) TACACGCTGGGAAACATGAG	Invitrogen	65	102
ZO-1	(F) GGGCCATCTCAACTCCTGTA (R) AGAAGGGCTGACGGGTAAAT	Invitrogen	65	164
ABCA1	(F) GCCCTACTGTCGGTTGACAT (R) ATGCCACACCCTGAACTGAG	Invitrogen	55	294
FAS	(F) CAAGTGTCCACCAACAAGCG (R) GGAGCGCAGGATAGACTCAC	Invitrogen	50	120
Vilina	(F) GTGGAGTAACACCAAAATCCT (R) ATCTGCCACAGGACTAAAAC	Invitrogen	65	419

Tabla 13: Primers utilizados para moléculas de origen murino, así como su secuencia, proveedor, temperatura de anillamiento y tamaño del amplicón en pares de bases.

6.3 Métodos

6.3.1 Técnicas de laboratorio

En esta sección se describen las técnicas empleadas. Las condiciones y requerimientos específicos de cada experimento se detallan en el texto o en los pies de figura en la sección de resultados, incluyendo las concentraciones de los anticuerpos primarios (entre paréntesis).

6.3.1.1 Preparación de las muestras para histología

El tejido se introdujo en una bandeja (colon del ratón) y se sumergió durante 24 horas en Methacarn -60% metanol, 30% cloroformo, 10% ácido acético-, o en formalina (biopsia endoscópica). Tras ello se realizó la deshidratación de la muestra con soluciones de etanol a concentración creciente (Laboratorios Krape), se hicieron tres baños con isoparafina (Krape), tres baños en parafina (Panreac) y con un micrótopo se hicieron cortes de 5 μm que se colocaron en portaobjetos para su tinción.

6.3.1.2 Tinción hematoxilina-eosina

Se retiró la parafina de los portaobjetos en la estufa (Memmert) y se hidrataron con concentraciones decrecientes de etanol. Se introdujeron durante 2-3 minutos en la tinción de hematoxilina de Carazzi (Krape), posteriormente se hicieron tres baños en la solución de eosina hidroalcohólica (Krape), y se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y se hicieron finalmente dos baños con isoparafina. Se montaron utilizando medio de montaje (Panreac, AppliChem). Se utilizó el microscopio óptico Nikon Eclipse E800 con cámara digital Nikon DXM1200F para la valoración de todos los objetivos histológicos.

6.3.1.3 Tinción de azul alcian

Tras la desparafinación en estufa y la hidratación con concentraciones decrecientes de alcohol se hizo un baño durante 30 minutos en azul alcian (Sigma-Aldrich), seguido de 5 minutos en agua destilada, y se incubó en hematoxilina durante otros 5 minutos. Tras ello se lavó con agua abundante, y se completó con la deshidratación y el montaje siguiendo el párrafo anterior.

6.3.1.4 Aislamiento de ARNm

La **extracción** se realizó utilizando TRIzol tanto en experimentos celulares (se añade al extracto celular) como en tejidos (se añade al Eppendorf durante la homogeneización). Se centrifugó la muestra con cloroformo, y al sobrenadante se le añadió isopropanol. Tras 10 minutos y una centrifugación retiramos el contenido líquido y añadimos etanol al 75%, dejamos secar el pellet y se dejó precipitar con acetato sódico y etanol al 100%. Se añadió etanol al 75% y finalmente se diluyó el pellet en 10 μ L de agua destilada.

Para la **medición** del ARN utilizamos el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Con las concentraciones de ARN halladas se realizó la solución de digestión de cada muestra utilizando el kit Turbo DNA-free (Invitrogen). Se realizó la **digestión** del ADN utilizando el termociclador IQ5 (Multicolor Real-time PCR Detection System, Bio-Rad). Añadimos la solución de inactivación de la DNAsa, y volvimos a medir la concentración del ARN e hicimos la solución para la síntesis de ADNc utilizando el kit iScript (Bio-Rad). Se introdujo en el termociclador para la **retrosíntesis** y obtención de ADNc.

6.3.1.5 Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcriptasa inversa (qPCR).

Para la qPCR se utilizó Sybrgreen Master Mix (Bio-Rad) y el termociclador IQ5. Todas las representaciones de los valores de qPCR se dan referenciadas a un gen que actúa como referencia. Las muestras se usaron siempre por triplicado.

6.3.1.6 Aislamiento proteico con RIPA.

Las muestras se homogeneizaron con el tampón *RIPA total* 1x utilizando un homogeneizador (Tissue Lyser, Qiagen), y posteriormente un sonicador (Labsonic, B. Braun), y en el sobrenadante se realizó la **medición** proteica con un espectrofotómetro Synergy HT (BioTek) tomando como referencia una recta patrón de albúmina sérica bovina en SDS al 1% en concentraciones crecientes. En la Tabla 14 se muestra la composición del tampón RIPA total 1x y del RIPA 2x necesario para su fabricación.

Tampón RIPA 2x (100 mL)	Tampón RIPA total 1x (30 mL)
10 mL 1M Tris/HCl pH 7.4	15 mL RIPA 2x
30 mL 1M NaCl	300 mL CIP (cóctel inhibidor de proteasas) (1/100)
2 mL Triton X-100	300 mL NaF 1M (fluoruro sódico) (1/100)
2 mL 10% SDS	300 mL Na ₃ VO ₄ (ortovanadato sódico) (1/100)
1 g NaDOC	14,1 mL agua destilada
56 mL Agua destilada	

Tabla 14: Composición del tampón RIPA total 1x y del RIPA 2x.

6.3.1.7 Western blot

Tras la extracción proteica se efectuó la electroforesis cargando la misma masa de proteínas en cada pocillo. Se utilizaron unos geles comercializados preparados para su uso (Mini-protean TGX Stain-Free Gels, Bio-Rad Laboratories) de tamaño pequeño (6,5x8 cm), con 10% acrilamida, con pocillos de carga de 30 µL. Tras la electroforesis y la transferencia se incubó durante 8 horas a 4°C con el anticuerpo primario. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, y se reveló utilizando el producto de revelado Amersham ECL

Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) y el sistema Alliance

4.7. El análisis densitométrico de las bandas se realizó con el programa Image J.

6.3.1.8 Tinción inmunohistoquímica (IHQ).

Las muestras parafinadas sobre los portaobjetos se hidrataron con concentraciones decrecientes de etanol, y tras el desenmascaramiento antigénico, la inhibición de la actividad de la peroxidasa endógena y el bloqueo, se incubaron con el anticuerpo primario durante 8 horas a 4°C. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, se deshidrataron y se tiñeron con hematoxilina. Se montaron con medio de montaje (Panreac, AppliChem) y se realizaron fotografías protocolizadas de todas las muestras al microscopio óptico.

6.3.1.9 Inmunofluorescencia en tejido.

Las secciones se fijaron en etanol frío al 95%, se bloquearon y se incubaron con el anticuerpo primario durante 8 horas a 4°C. Tras ello se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente, faloidina conjugada con FITC y DAPI durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, las muestras fueron montadas con medio de montaje de fluorescencia (Dako), y fueron escaneadas usando el microscopio confocal AOBS/SP2 invertido (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y las imágenes se analizaron con el programa informático Image J.

6.3.1.10 Ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA).

Se utilizó el kit de ELISA para IL-8 humana Ready-set-Go! 2nd Generation (eBioscience). Para la medición se utilizó un espectrofotómetro Sinergy HT (BioTek). Se aportan los valores de la concentración de IL-8 en pg/mL.

6.3.1.11 Inmunofluorescencia en células cultivadas.

Se sembraron las células en los pocillos sobre un cristal autoclavado, que se calentó previamente a 37°C con gelatina (Sigma-Aldrich). Tras el experimento se bloquearon los cristales, se permeabilizaron y se incubaron con el anticuerpo primario durante 8 horas a 4°C. Se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente dirigido contra el anticuerpo primario, faloidina conjugada con FITC, así como el compuesto DAPI. Los cristales se montaron con medio de montaje (Dako) para muestras fluorescentes. Se evaluó la fluorescencia en los diferentes canales con un microscopio confocal. Se tomaron imágenes aleatorias de cada porta, y se cuantificó la fluorescencia nuclear.

6.3.2 ESTUDIO EN HUMANOS

6.3.2.1 Selección y reclutamiento de los pacientes

Se reclutaron pacientes con EII que se sometieron a una colonoscopia como parte de su seguimiento, tras informarles debidamente y firmar el consentimiento informado. De la misma manera se incluyeron pacientes control, asintomáticos y sin diagnóstico de EII, que se realizaron una colonoscopia por seguimiento de pólipos o por rectorragia de perfil hemorroidal. El tiempo de seguimiento de los pacientes con EII fue de 12 meses tras la colonoscopia, y se registraron las colonoscopias subsiguientes realizadas.

6.3.2.2 Criterios de inclusión y exclusión

Los pacientes fueron incluidos desde mayo de 2014 hasta enero de 2019. En las Tablas 15 y 16 se especifican los criterios de inclusión y exclusión empleados para los sujetos con EII y para los controles, respectivamente:

Pacientes con Enfermedad inflamatoria intestinal	
Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Edad >18 años	CU sin segmento inflamado de colon
Diagnóstico confirmado de enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o colitis inclasificable	CU sin segmento indemne de colon
Solicitud de colonoscopia fuera del contexto del estudio	EC con afectación exclusivamente ileal
Firma de consentimiento informado	Reurrencia postquirúrgica exclusivamente ileal
	Estenosis infranqueable
	No retirada de anticoagulación/antiagregación
	Comorbilidad de riesgo para sedación endoscópica

Tabla 15: Criterios de inclusión y exclusión en el estudio realizado en biopsias endoscópicas de colon en pacientes con EII.

Pacientes control	
Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Edad >18 años	Presencia de diarrea crónica
Solicitud de colonoscopia fuera del contexto del estudio	Inflamación mucosa en la colonoscopia
Sin antecedentes de EII, ni ileocolitis de otras causas	No retirada de anticoagulación/antiagregación
Firma de consentimiento informado	Comorbilidad de riesgo para sedación endoscópica

Tabla 16: Criterios de inclusión y exclusión en el estudio realizado en biopsias endoscópicas de colon en pacientes controles.

6.3.2.3 Colonoscopia

Las colonoscopias se realizaron siguiendo el protocolo habitual de la Unidad de Endoscopia del HGUGM en horario de tarde, que se adhiere a las recomendaciones establecidas de preparación de colon (189). Tres días antes del procedimiento los pacientes realizan una dieta pobre en residuos. La mañana de la prueba se administró un preparado laxante osmótico: polietilenglicol 4000

(Laboratorios Bohm) o una combinación de picosulfato sódico, óxido de magnesio ligero y ácido cítrico anhidro (CitraFleet, Casen Recordati). Todas las colonoscopias se realizaron con sedación utilizando propofol (Fresenius Kabi España) a 10mg/kg por vía intravenosa, con rescates adicionales en caso de necesidad. Se usaron colonoscopios de alta definición (CF-H190L, Olympus), conectados al procesador de imagen Evis Exera III CLV-190 (Olympus) con insuflación de CO₂ (UCR, Olympus). Se tomaron 2 muestras de mucosa de colon inflamada y otras 2 de mucosa de colon indemne utilizando una pinza de biopsia de 2,4 mm de amplitud (Radial Jaw 4, Boston Scientific). Las biopsias de un grupo de pacientes se utilizaron para técnicas de western blot, para lo cual se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron en un congelador de -80°C. Las biopsias de otro grupo de pacientes se utilizaron para el estudio anatomopatológico e IHQ, para lo cual se introdujeron en un frasco con una solución de formalina para su procesamiento en el departamento de Anatomía Patológica. A los pacientes control se les tomaron 2 muestras aleatorias de colon que se utilizaron para western blot, estudio anatomopatológico e IHQ.

6.3.2.4 Evaluación clínica, endoscópica e histológica de los pacientes.

Se registraron las siguientes variables presentes en la historia clínica electrónica: edad, sexo, tipo de enfermedad (CU, EC, CI), comorbilidad relevante, hábitos tóxicos y tratamientos actuales. Las valoraciones clínicas, endoscópicas e histológicas se efectuaron de acuerdo con las diferentes clasificaciones existentes para tal efecto:

En la *colitis ulcerosa*: se utilizó la clasificación de Montreal (190), y el índice de Mayo (191) para la valoración clínica y clínico-endoscópica, respectivamente.

Para la valoración histológica se utilizó el índice de Sandborn para colitis ulcerosa (192) que estadifica la inflamación histológica en 4 grados: normal, leve, moderada y grave. Posteriormente se eligió el índice de Riley (193) modificado para la valoración pormenorizada de un subgrupo de los pacientes con CU y los controles.

En la *enfermedad de Crohn*: se utilizó la clasificación de Montreal específica para EC (190) y el índice de Harvey-Bradshaw (194) como parámetros clínicos. Para la valoración endoscópica se utilizó el *Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease* (SES-CD) (195). La valoración histológica se llevó a cabo usando el índice de Baars para la enfermedad de Crohn (196), que estadifica la inflamación histológica en 4 categorías: normal, leve, moderada y grave.

6.3.3 ESTUDIO EN RATONES

6.3.3.1 Modelo de ratones deficientes en IL-10

Todos los procedimientos relativos al mantenimiento y cuidado de los animales se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio (National Research Council, 1996) y en cumplimiento de la legislación de la Unión Europea (Directriz 2010/63/EU) y del Real Decreto RD53/2013 (European Commission, 2010), y fueron aprobados por la Comunidad de Madrid (PROEX 147-14, 276-15 y 259-16). Como alternativa a los modelos químicos, más agudos y agresivos, para el estudio de la EII, utilizamos un modelo de ratón que es probablemente más representativo de la enfermedad: la enterocolitis crónica desarrollada de manera espontánea por ratones deficientes en la interleucina 10 (IL-10^{-/-}). A partir de una pareja de progenitores de ratones modificados genéticamente (The Jackson Laboratories) y otra de ratones salvajes C57BL/6 (en adelante Wild-type, The Jackson Laboratories) se establecieron

colonias estables. Solo se incluyeron en el estudio ratones macho. Se estabularon en racks ventilados, a temperatura y humedad constantes, con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad y se alimentaron *ad libitum*. Los ratones que desarrollaron prolapso rectal fueron sacrificados y excluidos del estudio. Los ratones fueron sacrificados a la edad de 18-20 semanas, previa valoración de las medidas de final del experimento (peso, situación general, existencia de prolapso rectal). Para el sacrificio se les introdujo en una cámara de CO₂ los primeros 3 minutos al 1% seguido de un aumento de la concentración al 3-4% hasta la ausencia de signos vitales, tras lo cual se realizó dislocación cervical. El colon de los ratones fue seccionado a nivel del recto suprapúbico y a nivel del íleon terminal, fue medido, pesado y conservado.

6.3.3.2 Valoración de la inflamación histológica en el colon de los ratones.

Se utilizó la tinción de hematoxilina-eosina, y el índice previamente descrito por Kim *et al.* (197). Para la valoración del subíndice de la depleción de células caliciformes se utilizó la tinción de azul de alcian.

6.3.4 ESTUDIO EN CULTIVOS CELULARES

6.3.4.1 Estudio *in vitro* en cultivos celulares.

Se utilizó la línea celular inmortalizada de cáncer de colon humano Caco-2 (HTB-37, ATCC), con fenotipo de enterocito maduro, en un pase de utilización entre 10 y 20. La línea fue adquirida comercialmente y almacenada en crioviales en nitrógeno líquido hasta su utilización. En ese momento se descongelaron, se mantuvieron en recipientes específicos en función del experimento (frascos T-75 con filtro, placas P-100, placas multipocillo P6, P12, P24) en un incubador de CO₂ a

37°C con 5% de CO₂ y con medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, 30-2003, ATCC) suplementado con suero fetal bovino al 20%. Un día antes de los experimentos de estimulación se usó medio con 2% de suero fetal bovino.

6.4 **Análisis estadístico**

Los datos de las variables continuas se presentan mediante su media y desviación estándar entre paréntesis. Para las variables categóricas, los datos se muestran en frecuencias y porcentajes. Las variables numéricas con distribución no normal, se presentan mediante su mediana y percentil 25 y percentil 75. El análisis de normalidad se estudió con la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Para estudiar las diferencias de medias entre 2 o más grupos, se utilizaron pruebas paramétricas (t de student o ANOVA) o pruebas no paramétricas (Mann-Whitney o Kruskal-Wallis) utilizando las más adecuadas en cada caso en función de la normalidad de los datos y del número total de pacientes/animales/placas de cultivos. La significación al comparar más de dos medias se realizó con la prueba de Tukey. La asociación entre variables cualitativas se estudió mediante la prueba Chi-cuadrado de Pearson o exacta de Fisher. La correlación entre variables cuantitativas se estudió con el coeficiente de Pearson o Spearman en función de si seguían una distribución normal o no. La asociación entre una variable cuantitativa y una cualitativa se valoró mediante Rho de Spearman. La valoración de las biopsias endoscópicas del segmento sano y enfermo del mismo paciente se realizó siguiendo la corrección de datos apareados. La prueba específica utilizada en cada experimento y los valores de *p* se indican en el correspondiente pie de figura en la sección de resultados.

Para el análisis estadístico se empleó el programa IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0 (Armonk, NY: IBM Corp), así como con el programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software). Se consideraron como estadísticamente significativos aquellos resultados con una $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 Patrones de expresión de LXR en biopsias endoscópicas de mucosa de colon.

7.1.1 Características basales de los pacientes

Entre mayo de 2014 y enero de 2019 se valoraron un total de 40 pacientes con EII a los que de acuerdo con la práctica clínica habitual se les solicitó una colonoscopia con toma de biopsias para seguimiento de su enfermedad. De ellos un total de 17 pacientes con EII fueron incluidos siguiendo los criterios de inclusión y exclusión previamente expuestos. En la Figura 6 se muestra el diagrama de flujo de selección, inclusión y exclusión de los pacientes.

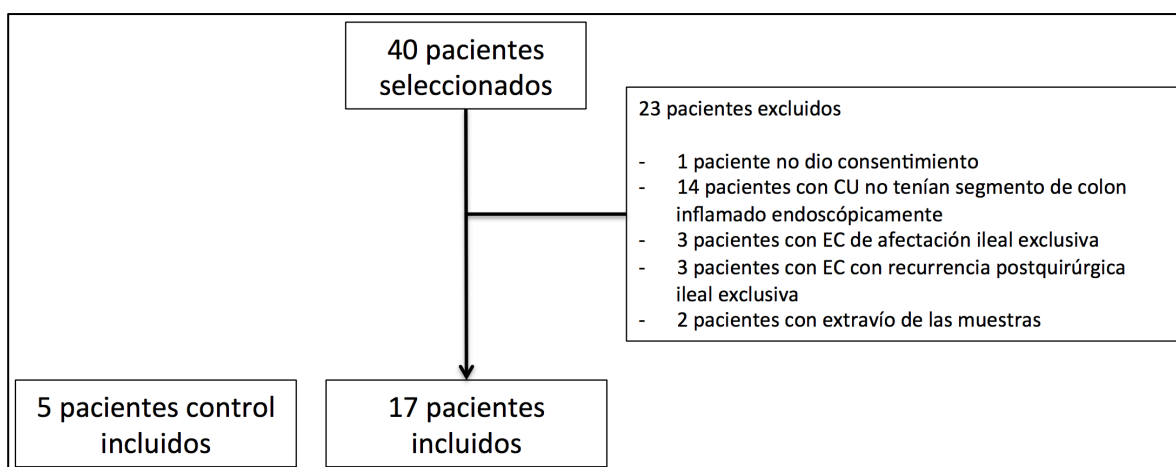


Figura 6: Diagrama de flujo de los pacientes valorados e incluidos en el estudio.

Las características clínicas basales de los pacientes incluidos se presentan en la Tabla 17.

	EII (n=17)	Controles (n=5)	p
Edad media (DE)	45,24 (14)	64,6 (13)	P=0,016
Sexo, % (varón)	47,1%	40%	P=0,793
Hábito tabáquico (%)			
• No	64,7		
• Sí	11,8		
• Ex fumador	5,9		
• Desconocido	17,6		
Tipo de EII (%)			
• CU	70,6		
• EC	23,5		
• Indeterminado	5,9		
Mayo basal parcial media (DE)	1,67 (1,67)		
Índice Harvey-Bradshaw basal media (DE)	2,20 (1,3)		
Hemoglobina, g/dL, media (DE)	14,05 (1,47)		
Leucocitos/microL (DE)	8023 (2359)		
PCR, mg/dL, media (DE)	0,51 (0,51)		

Tabla 17: Características basales, demográficas y de laboratorio de los pacientes con EII (n=17) y de los sujetos control (n=5).

Previamente a la realización de la colonoscopia los pacientes tenían un control sintomático adecuado, siendo la media del índice de Mayo parcial de 1,67 para los pacientes con CU, mientras que la media del índice de Harvey-Bradshaw para los pacientes con EC fue de 2,2. Ningún paciente había sido intervenido previamente por su EII luminal. Los parámetros de la Clasificación de Montreal se muestran en la Tabla 18. No se incluye el paciente con colitis indeterminada.

Enfermedad de Crohn (n=4)	A (Edad), % • 1 • 2 • 3	0 100 0	Colitis ulcerosa (n=12)	E (Extensión) % • 1 • 2 • 3	8,3 66,7 25
	B (Comportamiento), % • 1 • 2 • 3	75 0 25		S (Severidad) % • 1 • 2 • 3	41,7 33,3 25
	L (Localización), % • 1 • 2 • 3 • +4	0 25 75 0			
	p (Enfermedad perianal)	0			

Tabla 18: Detalle de los parámetros de la clasificación de Montreal de los pacientes con enfermedad de Crohn (n=4) y colitis ulcerosa (n=12) incluidos en el estudio.

En el momento de la colonoscopia un 23% de los pacientes estaba en tratamiento con un fármaco anti-TNF α , un 17,6% estaba en tratamiento con azatioprina, un 11,8% estaba con corticoides orales de acción tópica (budesonida o dipropionato de beclometasona) y el 76,5% de los pacientes estaba en tratamiento con mesalazina. Ningún paciente estaba recibiendo corticoterapia sistémica.

En el año siguiente a la colonoscopia el 29,4% precisó un incremento de la intensidad del tratamiento, el 11,8% requirió ingreso hospitalario y el 5,9% requirió una cirugía. El 64,7% (11 pacientes) tenía al menos una **colonoscopia posterior** a la evaluada, una media de 3,2 años tras la colonoscopia índice. El índice de Mayo en dicha colonoscopia posterior fue de 0,88 (0,83) y el SES-CD fue de 3,7 (3,9). Ninguno de los pacientes presentó una neoplasia de colon ni displasia epitelial sin lesión de colon en las colonoscopias evaluadas. Tampoco hubo

pacientes con colitis ulcerosa en los que se demostrara progresión proximal de la colitis. A tres pacientes (27%) se les resecaron pólipos menores de 1 cm con displasia de bajo grado en un segmento endoscópicamente indemne.

7.1.2 Grado afectación endoscópica de los pacientes

En la Figura 7 se muestran las imágenes endoscópicas con ejemplos de los ítems valorados en los índices de actividad endoscópica de los pacientes con EC (SES-CD) y de los pacientes con CU (subíndice endoscópico de la Clasificación de Mayo). También se muestran las puntuaciones de dichos índices en los pacientes incluidos. Ningún paciente control presentó inflamación endoscópica.

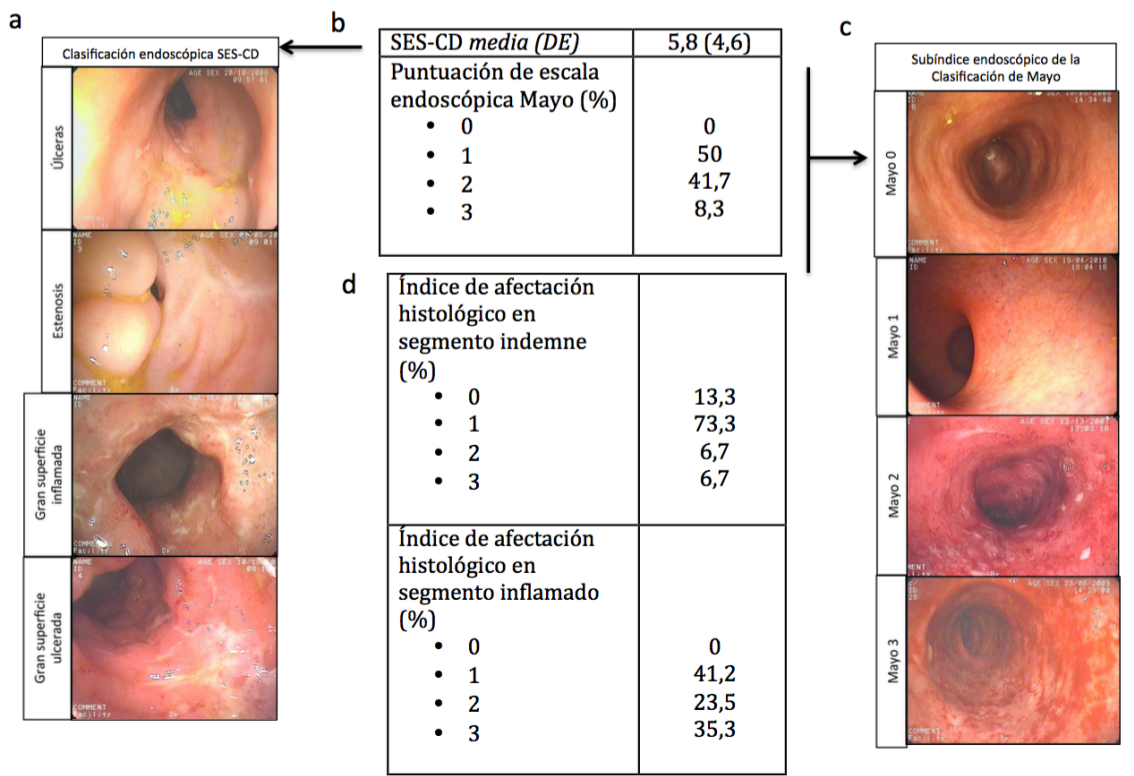


Figura 7: Valoración endoscópica e histológica de los pacientes con EII. **(a)** Imagen representativa de cada ítem de la clasificación endoscópica SES-CD para los pacientes con enfermedad de Crohn y **(c)** de la clasificación endoscópica de Mayo para los pacientes con colitis ulcerosa. **(b)** Valores de dichas clasificaciones en los pacientes incluidos (n=12 para CU, n=4 para EC con afectación de colon). **(d)** Grado de afectación inflamatoria histológica de las biopsias tanto de mucosa endoscópicamente indemne como inflamada según los índices de Sandborn (CU) y Baars (EC).

7.1.3 Grado de afectación histológica. Concordancia endoscopia-histología

En la Figura 7 (ver más arriba) se muestra el grado de inflamación histológica de acuerdo con la escala leve, moderado y grave del índice de Sandborn para CU y el de Baars para EC. Ningún paciente con mucosa macroscópicamente inflamada presentó ausencia de inflamación histológica, si bien de los segmentos endoscópicamente indemnes el 86,7% presentó algún grado de inflamación histológica. La correlación entre el valor del índice endoscópico (máximo valor del subíndice endoscópico de Mayo) y el histológico en el segmento endoscópicamente inflamado (utilizando el índice de Sandborn) se calculó en los pacientes con colitis ulcerosa (n=12) y mostró un coeficiente de Spearman para muestras no paramétricas de 0,412 (p=0,183).

El siguiente paso consistió en estudiar de manera pormenorizada el grado de inflamación en los segmentos indemne e inflamado de los pacientes con **CU** y en 4 sujetos control. En la Figura 8 se muestran imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina de los ítems del índice de Riley. El resultado de la cuantificación del índice se muestra en la Figura 9. No hubo diferencias significativas al comparar el índice histológico de inflamación de Riley del segmento indemne e con el endoscópicamente inflamado de los pacientes con CU. Los pacientes control mostraron menor inflamación histológica que los pacientes con CU en su segmento inflamado, no así en relación con los indemnes.

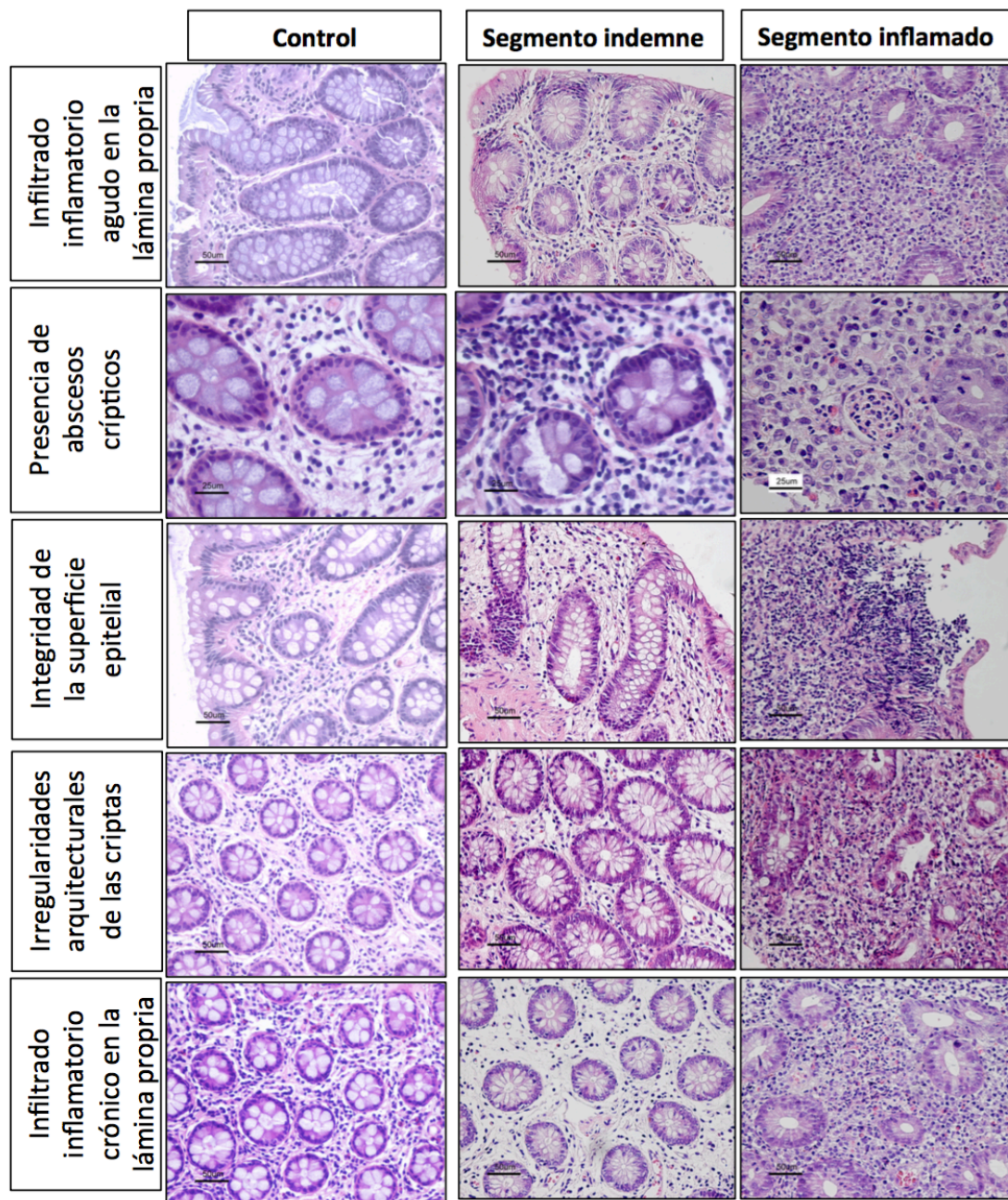


Figura 8: Imágenes histológicas representativas (hematoxilina-eosina) según la clasificación de Riley de los pacientes con colitis ulcerosa y de los pacientes control.

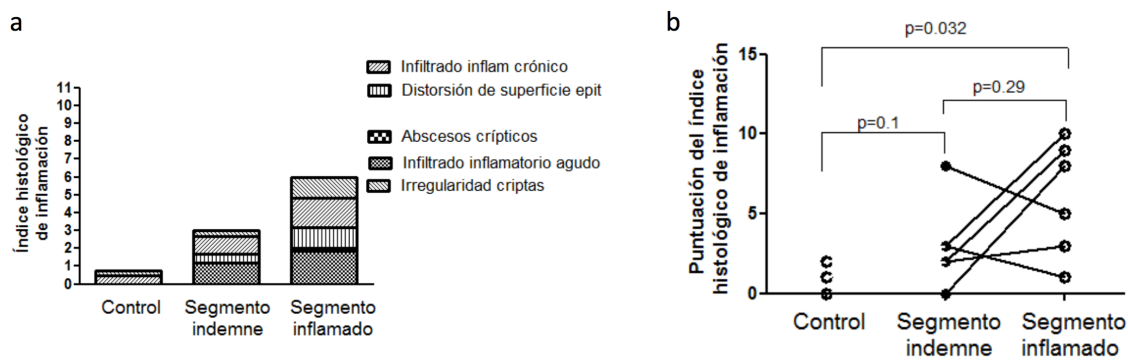


Figura 9: Cuantificación del índice de Riley en el colon de los pacientes con CU (n=6) y los controles (n=4). **(a)** Cuantificación de los ítems del índice de inflamación histológica de la mucosa del colon según el índice de Riley. **(b)** Comparación de la puntuación global del índice de inflamación histológica de la mucosa del colon entre los segmentos endoscópicamente indemne (n=6) y el inflamado (n=6), así como en la biopsia de colon en pacientes control (n=4). Se ha utilizado la prueba de Mann-Whitney para datos apareados como método de comparación entre mucosa indemne e inflamada de los pacientes con colitis ulcerosa, y Mann-Whitney con datos independientes para la comparación de medias entre ambos segmentos y los controles.

7.1.4 Niveles de expresión de LXR $\alpha\beta$ por western blot en las biopsias endoscópicas de los segmentos indemne e inflamado de pacientes con EII.

Se obtuvo el extracto proteico de las biopsias endoscópicas de los segmentos indemne y enfermo de 11 pacientes con EII (6 con CU, 4 con EC y 1 con CI) y del colon sano de los 5 pacientes control, y se valoraron las diferencias de la cuantificación de LXR $\alpha\beta$. En la Figura 10 se muestra la imagen representativa de la membrana así como la cuantificación, demostrando una menor presencia de LXR $\alpha\beta$ en las biopsias de ambos segmentos de los pacientes con EII con respecto a los controles. No se observaron diferencias entre los valores de los segmentos indemne e inflamado.

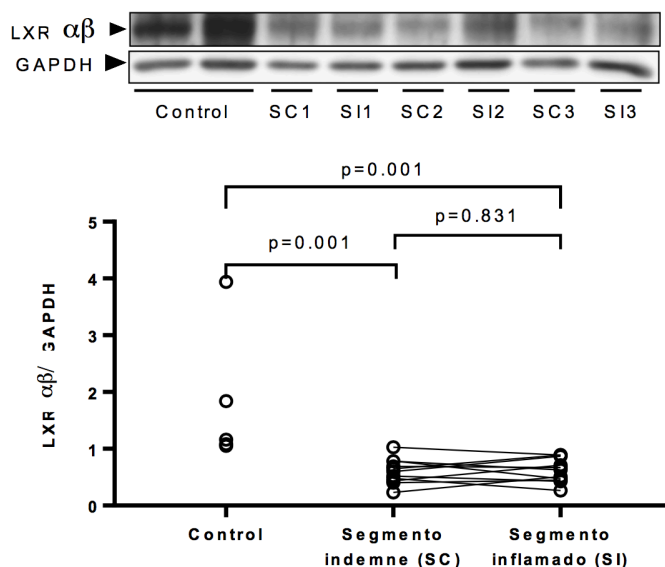


Figura 10: Imagen de la membrana y representación de la cuantificación del western blot para LXR $\alpha\beta$ (1:100) referenciado a GAPDH (1:1000), en biopsias de colon indemne e inflamado de pacientes con EII (n=11) así como de pacientes control (n=5). Se ha utilizado la prueba de Mann-Whitney para datos apareados como método de comparación entre mucosa indemne e inflamada de los pacientes con EII, y Mann-Whitney con datos independientes para la comparación entre ambos segmentos y los controles.

Así mismo, en la Figura 11 se representan los datos apareados del análisis densitométrico de los pacientes con EII, tanto relativo a GAPDH como de manera absoluta, medición que testamos al no estar validada la normalización con GAPDH. No se observaron diferencias ni tendencias entre los valores de ambos segmentos.

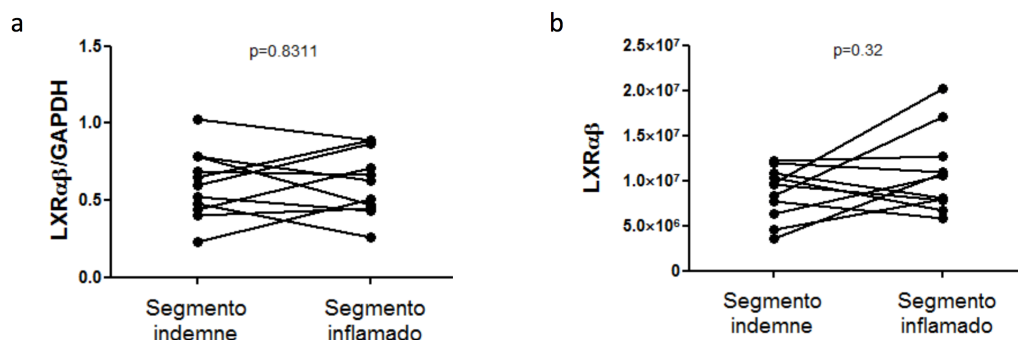


Figura 11: Cuantificación del western blot para LXR $\alpha\beta$ en biopsias de colon de pacientes con EII (n=11) **(a)** referenciada a la proteína de referencia GAPDH y **(b)** de manera absoluta. Se ha utilizado el test de Mann-Whitney para datos apareados

Posteriormente realizamos varios subanálisis para evaluar si el resultado obedece a algún tipo de tendencia en función de las características de los pacientes. En la Figura 12 se muestran los resultados de los pacientes con CU, EC, los que recibían tratamiento biológico, varones y mujeres por separado. No se observan diferencias significativas entre ambos segmentos en ninguno de los subgrupos, si bien los pacientes con enfermedad de Crohn y tratamiento biológico presentan una disminución uniforme de la cuantificación de LXR $\alpha\beta$ en el segmento inflamado, no significativo.

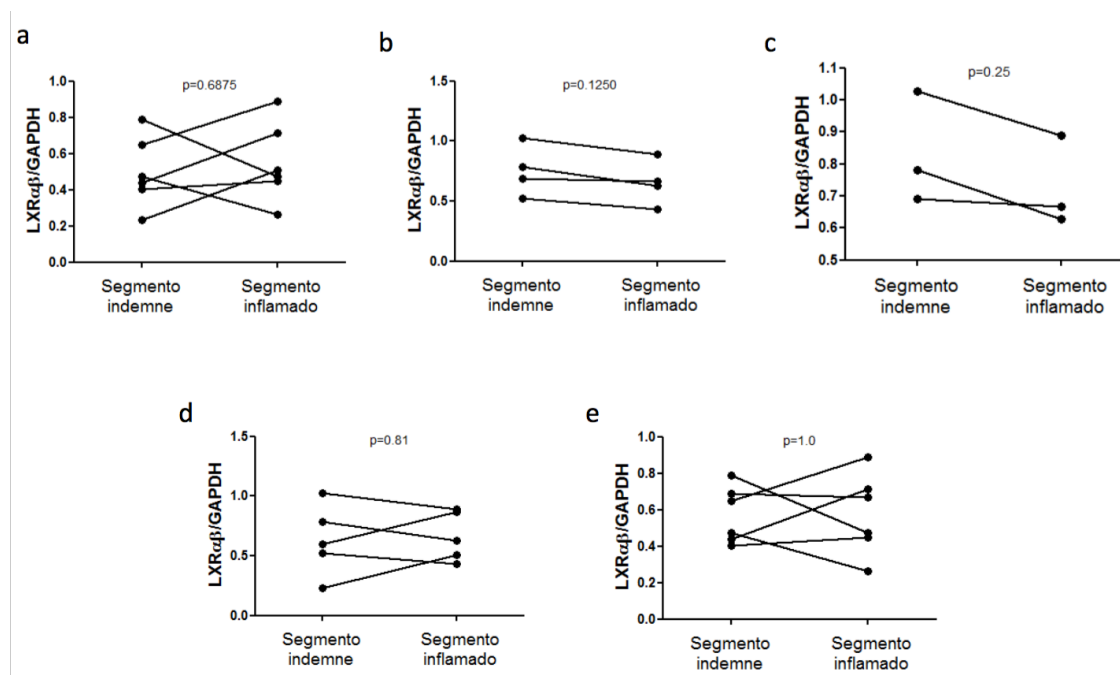


Figura 12: Cuantificación del western blot de LXR $\alpha\beta$ referenciada a GAPDH entre los segmentos indemnes e inflamados de pacientes con (a) colitis ulcerosa (n=6), (b) con enfermedad de Crohn (n=4), (c) bajo tratamiento biológico (n=3), (d) en varones (n=5) y (e) en mujeres (n=6). Se ha utilizado el test de Mann-Whitney para datos apareados.

Así mismo se correlacionó el valor densitométrico de LXR $\alpha\beta$ en el segmento indemne e inflamado ajustado a GAPDH con variables demográficas y clínicas relevantes. No hubo significación estadística en las correlaciones del segmento

inflamado. En el segmento **indemne** se observó significación en la correlación positiva con el índice de Harvey basal (a más Harvey mayor LXR $\alpha\beta$, Rho 0,975, p=0,05), y negativa con la toma de mesalazina por vía oral (Rho -0,598, p=0,05). No se observó correlación con el resto de variables.

7.1.5 Evaluación de la expresión de LXR $\alpha\beta$ por IHQ en las biopsias endoscópicas de segmento indemne e inflamado de pacientes con EII.

Al no observar cambios entre el segmento inflamado y el indemne –que consideramos su mejor control– en la cuantificación de LXR $\alpha\beta$ en la valoración de la mucosa en su totalidad (epitelio, lámina propia y muscular de la mucosa, elementos habitualmente presentes en las biopsias endoscópicas de colon) decidimos efectuar una aproximación centrada en el epitelio, teniendo en cuenta su papel en la regulación de la homeostasis, función de barrera, y especialmente en la orquestación de la respuesta inmune aberrante en la EII. Siguiendo los protocolos previamente descritos se realizó una tinción IHQ para LXR $\alpha\beta$ en las biopsias endoscópicas de los segmentos de colon indemne e inflamado de un total de 7 pacientes con EII –6 pacientes con CU y uno con EC–, así como en 4 pacientes control. En la Figura 13 se muestra la tinción del control negativo (izquierda, isotipo control) y del positivo del anticuerpo primario para LXR $\alpha\beta$.

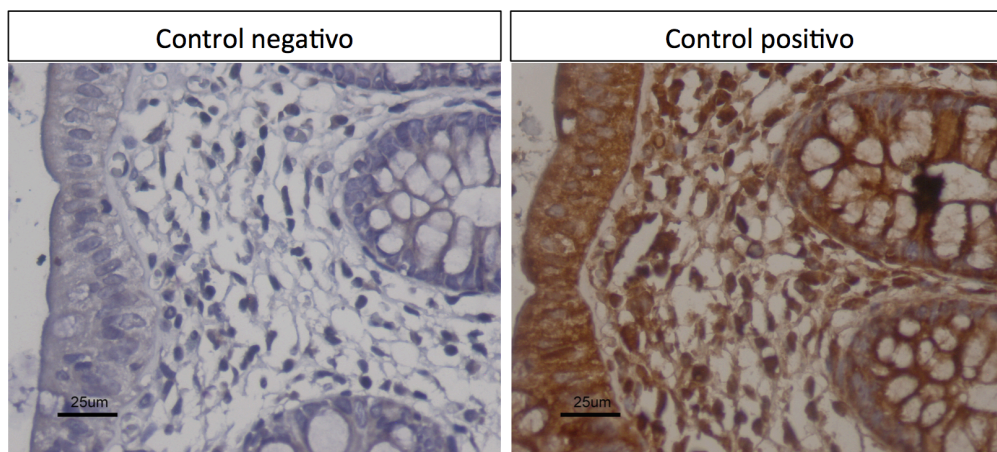


Figura 13: Imágenes a 40 aumentos de la tinción IHQ de LXR $\alpha\beta$ en biopsias de colon humano inflamado, tanto el control negativo como el positivo (1:10)

La Figura 14 muestra imágenes representativas de la tinción IHQ de LXR $\alpha\beta$ en las biopsias endoscópicas de segmento indemne e inflamado de los pacientes con EII así como de los pacientes control.

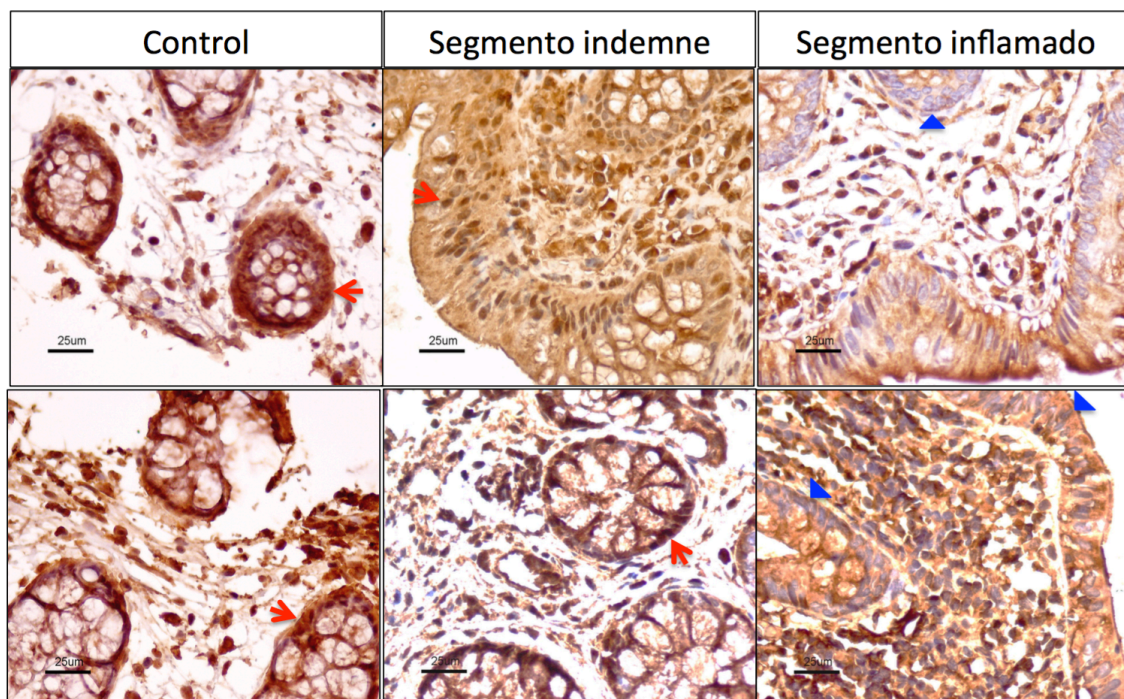


Figura 14: Imágenes representativas de inmunohistoquímica para LXR $\alpha\beta$ (1:10) en biopsias endoscópicas de colon de controles sanos, y de segmento indemne y de segmento inflamado de pacientes con EII. Se muestran ejemplos de núcleos positivos (flecha roja) y negativos (punta de flecha azul)

Se cuantificaron el número de núcleos positivos en el epitelio del colon. La Figura 15 muestra el conteaje del número de núcleos positivos para LXR $\alpha\beta$ por cada 100 células epiteliales en los segmentos indemne e inflamado de cada paciente con EII y de los controles. Se observó un menor número de núcleos positivos epiteliales en el segmento inflamado con respecto al indemne ($p=0,0313$), así como un menor conteaje en ambos segmentos con respecto a los pacientes control.

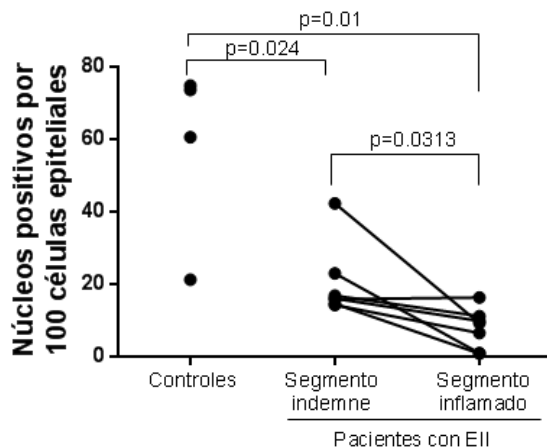


Figura 15: Núcleos positivos para LXR $\alpha\beta$ por cada 100 células epiteliales en segmento indemne e inflamado de cada paciente con EII ($n=7$), así como de pacientes control ($n=4$). Se ha utilizado el test de Mann-Whitney para datos apareados como método de comparación entre mucosa indemne e inflamada de los pacientes con EII, y Mann-Whitney con datos independientes para la comparación entre ambos segmentos y los controles.

El subanálisis de los pacientes con CU ($n=6$, Figura 16) presentaron un comportamiento más homogéneo, manteniendo significación estadística.

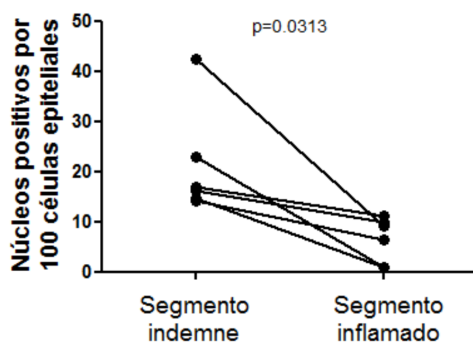


Figura 16: Núcleos positivos para LXR $\alpha\beta$ por cada 100 CEI en segmento indemne e inflamado de los pacientes con CU ($n=6$). Se ha utilizado la prueba de Mann-Whitney para datos apareados.

Además, se correlacionó el conteo de núcleos positivos para LXR $\alpha\beta$ en el segmento inflamado e indemne con diferentes variables demográficas, clínicas, endoscópicas e histológicas. Se observó una correlación negativa significativa del conteo nuclear en el **segmento inflamado** con el índice histológico de inflamación de Riley (para n=6 pacientes con CU, Rho de Spearman -0,829, p=0,042), y con la edad (Rho -0,821, p=0,023). No se observó correlación significativa con las demás variables. Seis pacientes se realizaron una colonoscopia subsiguiente. No hubo correlación significativa entre el conteo de los núcleos positivos para LXR $\alpha\beta$ en el segmento inflamado de colonoscopia índice con el subíndice endoscópico de Mayo de la segunda colonoscopia (Rho -0,432; p=0,392), SES-CD (p=1) ni con la existencia de pólipos en la colonoscopia posterior (Rho 0,293, p=0,573). Así mismo se correlacionó el valor del conteo nuclear de LXR $\alpha\beta$ en el **segmento indemne** con diferentes variables. Se observó correlación negativa con el índice de Mayo parcial (Rho -0,812; p=0,05) e índice de Mayo total (Rho -0,812; p=0,05). No se observó significación en la correlación con las demás variables relevantes.

7.1.6 Localización intracelular de LXR.

Con el microscopio óptico y a 100 aumentos se valoró la localización de la tinción para LXR $\alpha\beta$ en las biopsias de colon indemne e inflamado, como se muestra en la Figura 17. Se observa que en las biopsias de los controles y del segmento indemne de los pacientes con EII la localización de la tinción es fundamentalmente nuclear, con menor tinción citoplasmática; en las de segmento inflamado se observa que los núcleos apenas captan tinción, mientras que el citoplasma se tiñe ampliamente.

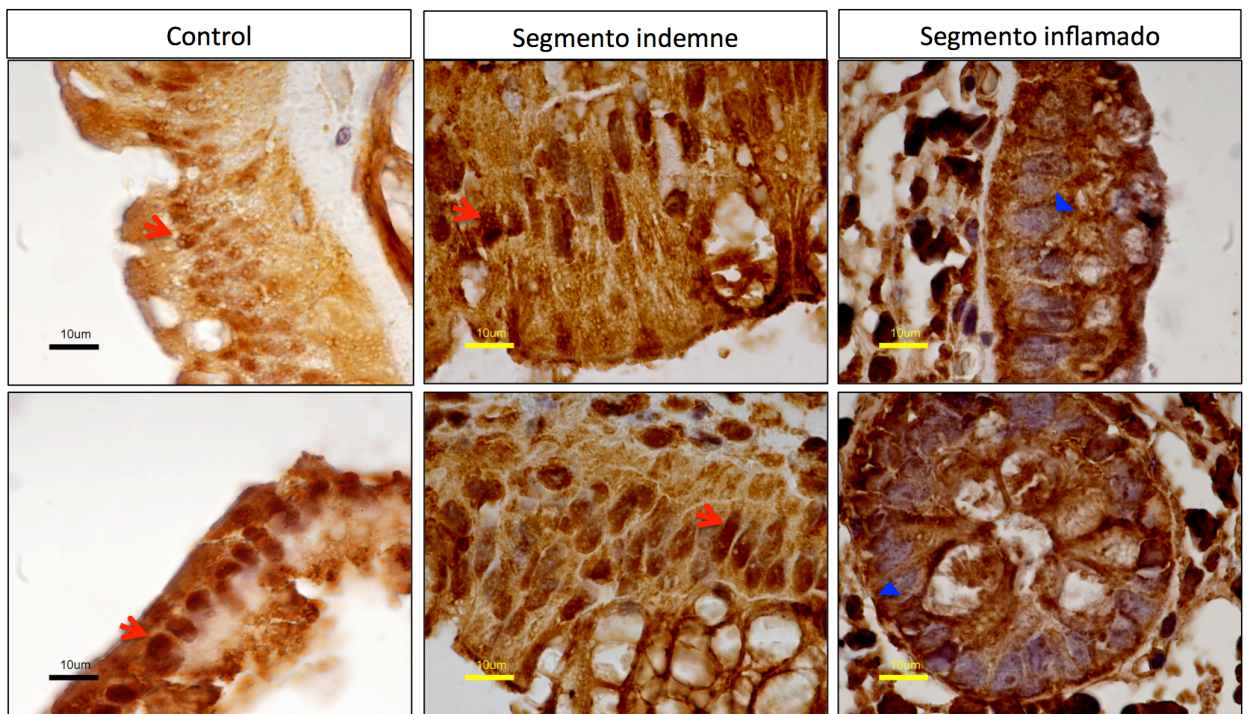


Figura 17: Imágenes con microscopía óptica a 100 aumentos de la tinción con IHQ para LXR $\alpha\beta$ (1:10) en las biopsias de colon de segmento indemne y de segmento inflamado. Se muestran células con núcleos positivos y citoplasma negativo (flecha roja) y células con núcleo negativo y citoplasma positivo (punta de flecha azul).

7.2 Caracterización de los ratones deficientes en interleucina 10 como modelo animal de enfermedad inflamatoria intestinal.

Una vez confirmada la relevancia de LXR $\alpha\beta$ en la inflamación epitelial de pacientes con EII se decidió profundizar en su estudio utilizando un modelo animal de EII. Para ello, y en primer lugar, se procedió a la caracterización general del modelo en nuestro laboratorio confirmando, como se detalla a continuación, el fenotipo inflamatorio descrito en la literatura.

7.2.1 Cálculo del tamaño muestral

De cara a emplear el número mínimo de animales, se calculó el tamaño muestral como diferencia entre dos proporciones, estimando una diferencia en la presencia epitelial de LXR del 30% entre los dos grupos de animales, esperando una proporción de 70% en el grupo Wild-type y de 40% en el grupo IL-10^{-/-}. Con un nivel de riesgo de 0,05, una potencia estadística del 80%, y unas pérdidas esperadas del 15% se estimó un tamaño muestral por grupo de 12 animales.

7.2.2 Características de la población de animales

Se incluyeron finalmente 12 ratones Wild-type y 19 ratones IL-10^{-/-}. Ninguno de los ratones Wild-type presentó prolapso rectal mientras que 3 de los ratones IL-10^{-/-} lo presentaron a lo largo de las 18-20 semanas de vida (Figura 18).

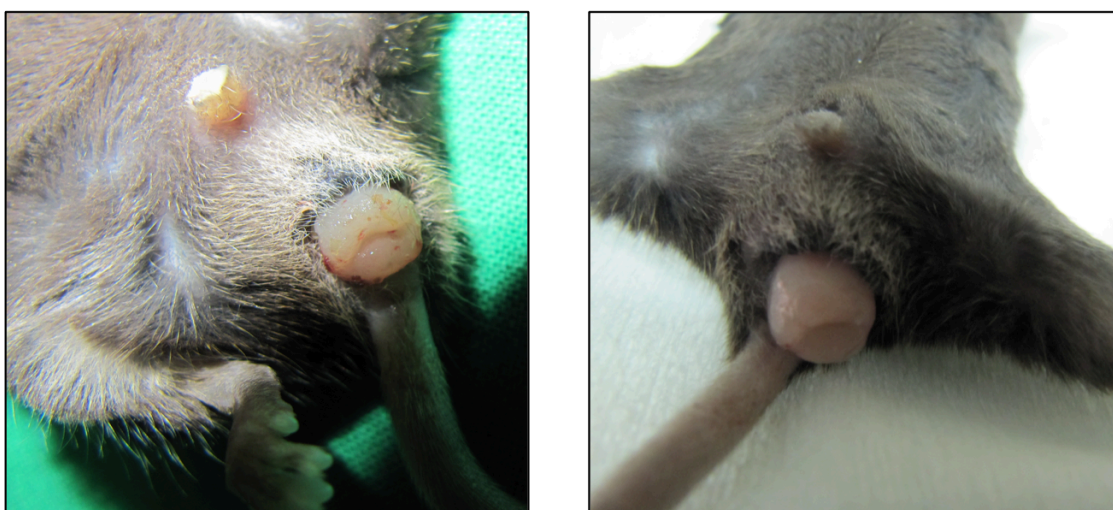


Figura 18: Imágenes representativas de prolapso rectal en los ratones IL-10^{-/-}.

En la semana 18-20 – momento en el cual el grado de colitis es máxima en el modelo, de acuerdo con nuestra experiencia (4) – se llevó a cabo la eutanasia de

los ratones, tras la cual se individualizó el colon de los animales, se pesó y se midió. Los resultados se muestran en la Figura 19.

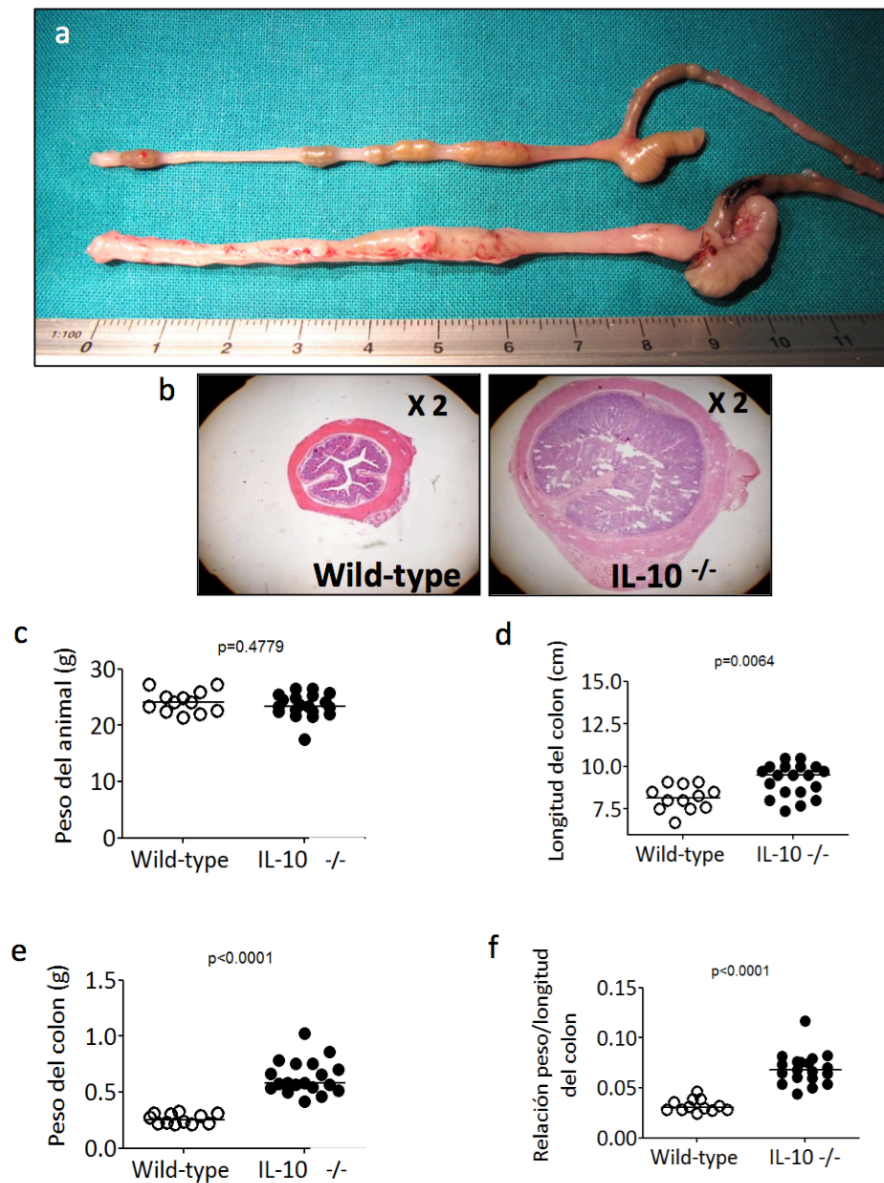


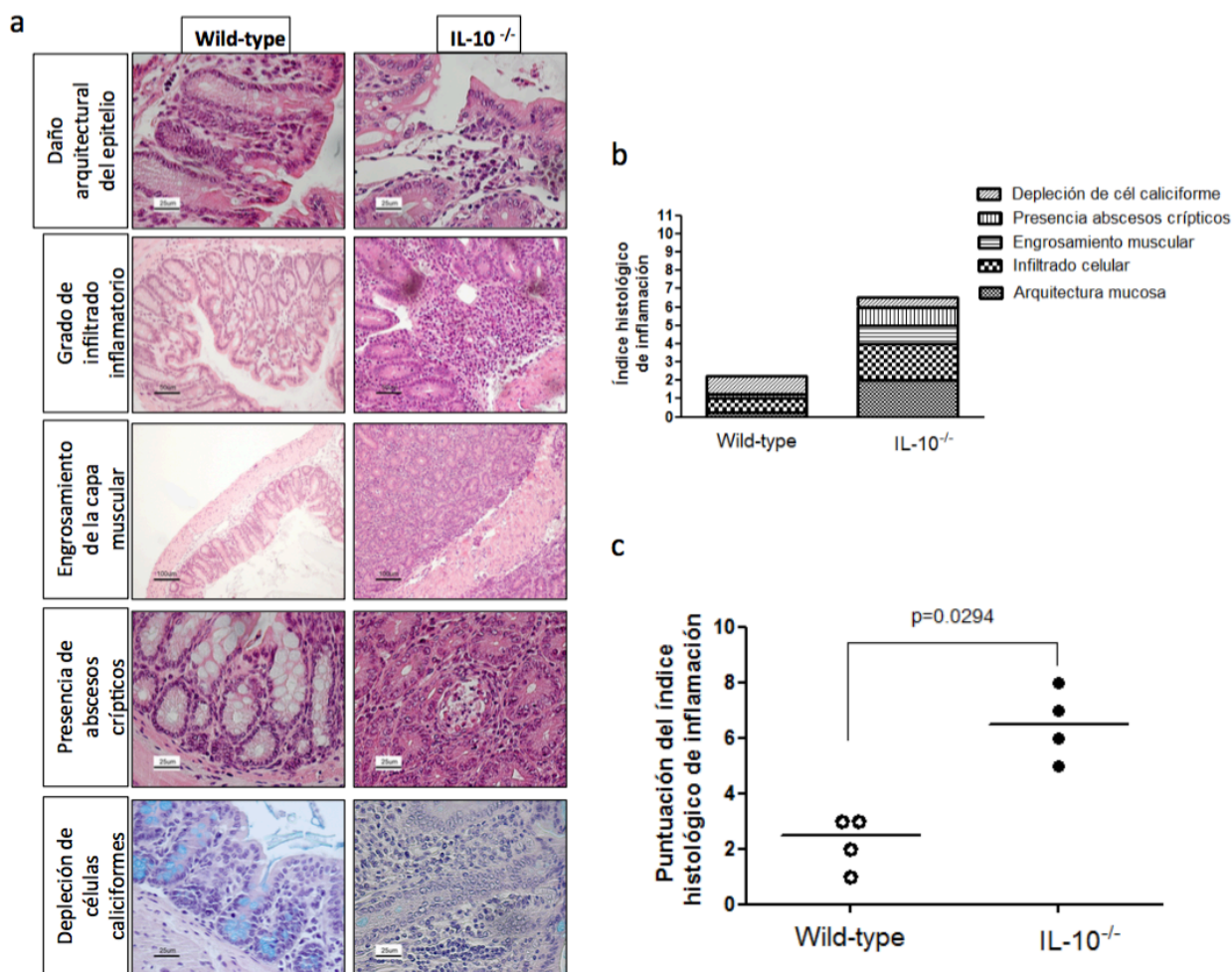
Figura 19: Características de los ratones en el momento del sacrificio. (a) Imagen comparativa de la pieza de colon del ratón Wild-type (arriba) y la del ratón IL-10^{-/-} (abajo). (b) Imagen comparativa de la sección a 2 aumentos de hematoxilina-eosina del colon del ratón Wild-type y la del ratón IL-10^{-/-}. (c) Peso del ratón, (d) longitud del colon en el momento del sacrificio, (e) peso del colon, (f) relación entre peso y longitud del colon en el momento del sacrificio de los ratones Wild type (n=12) comparado con ratones IL-10^{-/-} (n=19).

Los animales IL-10^{-/-} y los Wild-type presentaron el mismo peso, mientras que el colon de los ratones IL-10^{-/-} fue más largo y más pesado. Así mismo, la

relación entre peso y longitud del colon (una medida indirecta del grado de inflamación) fue significativamente mayor en los ratones IL-10^{-/-}, lo que sugiere un aumento del edema del colon en estos ratones secundario a inflamación colónica. Por último, en el estudio histológico a bajo aumento se puede apreciar el mayor diámetro de sección en el grupo IL-10^{-/-} debido fundamentalmente al edema, hiperplasia e infiltrado inflamatorio presentes en la mucosa y la submucosa.

7.2.3 Evaluación microscópica de la afectación inflamatoria en el colon del ratón.

La evaluación histológica se realizó en un número representativo de ratones escogidos de manera aleatoria. Se realizó la tinción de hematoxilina-eosina y posteriormente se evaluó el grado de afectación inflamatoria histológica del colon siguiendo la clasificación de Kim (197). En la Figura 20 se muestran ejemplos de cortes en hematoxilina-eosina de los ítems del índice de evaluación histológica de los animales Wild-type (n=4) y de los de los ratones IL-10^{-/-} (n=4). Se observó que la puntuación del índice era superior de manera significativa en los ratones IL-10^{-/-}, y todos los ítems del índice fueron superiores en el ratón IL-10^{-/-} a excepción de la depleción de células caliciformes.



7.2.4 Niveles de expresión de moléculas pro-inflamatorias en el colon del ratón.

Las piezas de colon también fueron utilizadas para extracción de ARNm y evaluación molecular con qPCR. En primer lugar se quiso confirmar que los hallazgos inflamatorios histológicos se correspondían con los hallazgos moleculares; para ello se analizaron los niveles de expresión de moléculas de la cascada inflamatoria, en este caso citocinas pro-inflamatorias como **TNF α** e **IL-1 β** , empleando β -actina como gen de referencia. Se observó, como se muestra en la

Figura 21, que los niveles de expresión de ambas citocinas estaban significativamente aumentados en los ratones IL-10^{-/-} comparado con los Wild-type.

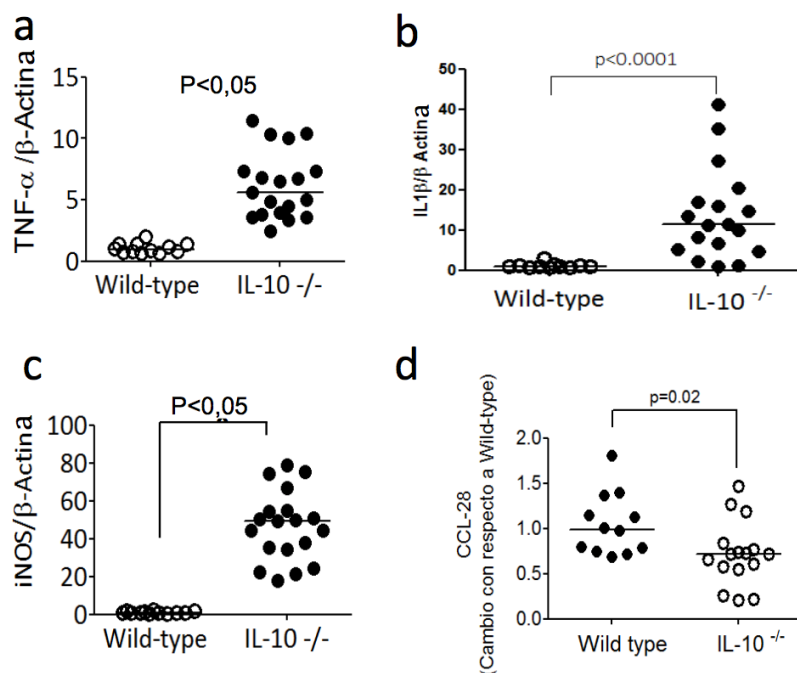


Figura 21: Cuantificación de las moléculas pro-inflamatorias en el colon de los ratones. Comparación de los niveles de ARNm de (a) TNF-α, (b) IL-1β, (c) iNOS y (d) CCL-28 en el colon de los ratones Wild-type (n=12) con respecto a los ratones IL-10^{-/-} (n=16). Se ha utilizado el test de Mann-Whitney como método de comparación.

La **óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)** es un enzima que cataliza el paso de L-arginina a L-citrulina produciendo óxido nítrico (NO), uno de los mediadores principales de la cascada inflamatoria (47). Por dicho motivo evaluamos su presencia en el colon de los animales y observamos que también había un aumento en el colon de los ratones IL-10^{-/-}. También se observó una disminución significativa de los niveles de ARNm de **CCL-28** –quimiocina que

regula la quimiotaxis de células CD4 y CD8 positivas (104)– en los ratones IL-10^{-/-}. Ambos resultados se muestran también en la Figura 21.

Así mismo, se valoró por IHQ la presencia nuclear de **NF-κB** – factor de transcripción clave en la regulación de la respuesta inmune (198) – en el epitelio del colon de ambos grupos de animales. Se puede observar en la Figura 22 un aumento de la positividad nuclear epitelial en el grupo IL-10^{-/-} con respecto al Wild-type.

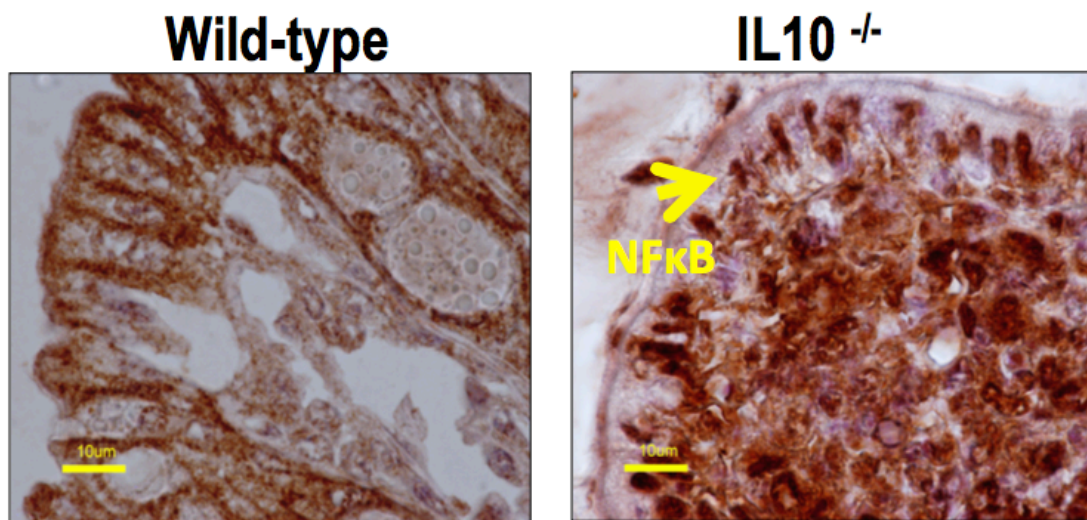


Figura 22: Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica para la subunidad p65 de NF-κB (1:50) en cortes de colon de ratón Wild-type y de IL-10^{-/-}. Se muestra la positividad nuclear (flecha amarilla).

7.2.5 Niveles de expresión de moléculas de adhesión intercelular y del citoesqueleto en el colon del ratón.

También se evaluaron en el colon de los ratones diferentes marcadores de función de barrera y de fenotipo del epitelio. Se observó que la expresión de ARNm de **E-cadherina** por qPCR y su expresión proteica por inmunofluorescencia indirecta (IFI) en tejido estaban disminuidas en el colon de los ratones IL-10^{-/-}. La

disminución del ARNm en el colon del animal IL-10^{-/-} también ocurrió con **ZO-1**. Por último, también se observó usando IFI en tejido una disminución de **F-actina** en los ratones IL-10^{-/-} comparado con los Wild-type. Dichos resultados se muestran en la Figura 23.

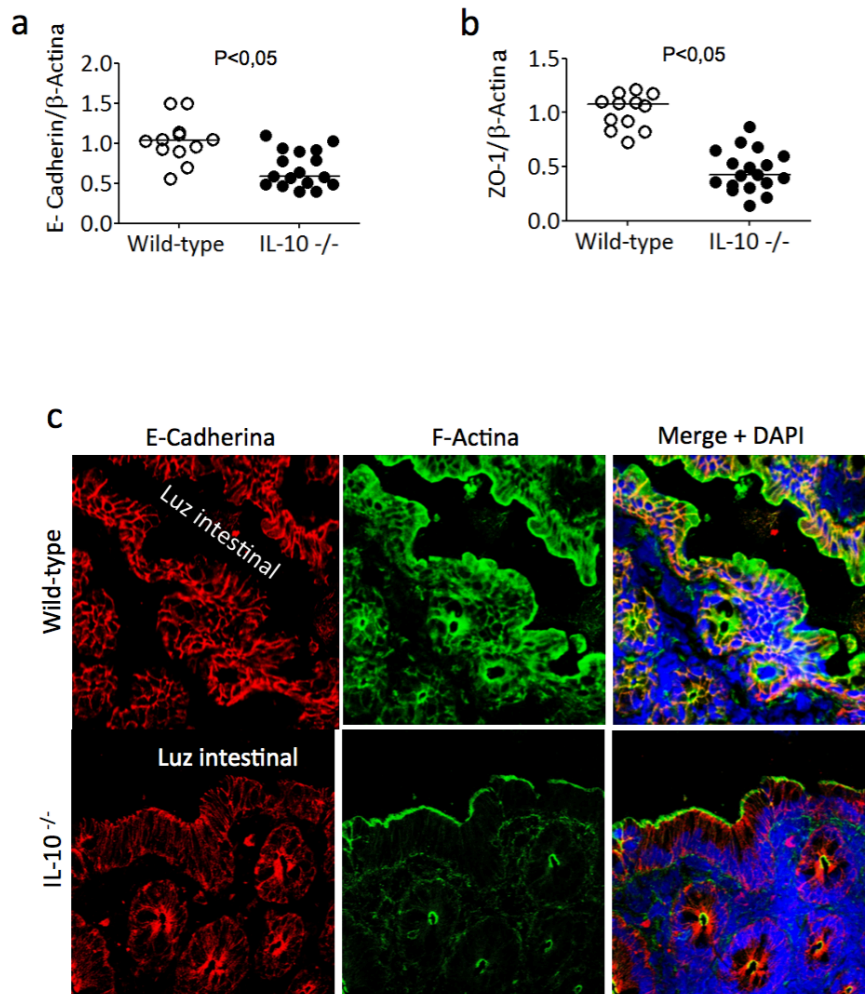


Figura 23: Proteínas de adhesión intercelular en el ratón. (a) Niveles de ARNm de E-Cadherina, (b) ZO-1 en el colon de los ratones Wild-type (n=12) con respecto a los ratones IL-10^{-/-} (n=16). Se ha usado β-Actina como gen de referencia. Se ha utilizado la prueba de Mann-Whitney como método de comparación. (c) Imágenes representativas de la tinción tisular por inmunofluorescencia para E-cadherina (1:500), F-actina polimérica (1:200) y de ambas tinciones superpuestas junto a la tinción nuclear DAPI (1:200) de cortes de colon de ratones Wild-type y ratones IL-10^{-/-}.

7.3 Análisis de la expresión de LXR y sus genes diana en el colon del ratón deficiente en IL-10.

7.3.1 Niveles de expresión de ARNm de las dos isoformas de LXR α y β en el colon del ratón.

Se evaluó el ARNm de ambas isoformas α y β de LXR mediante qPCR, observando una disminución de la **isoforma α** y de la **β** en el colon de ratones IL-10^{-/-} comparado con ratones Wild-type (Figura 24).

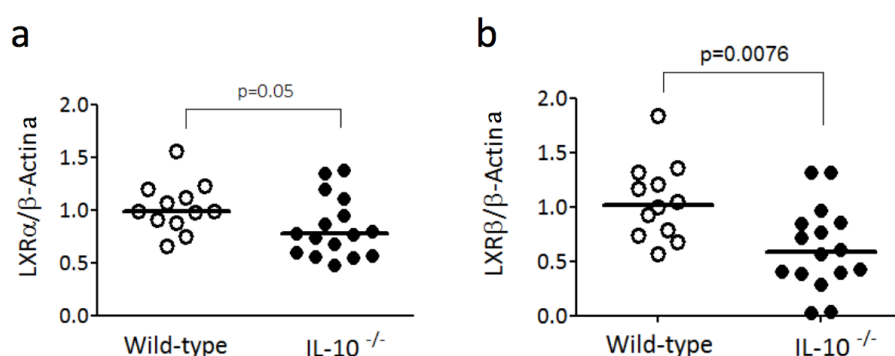


Figura 24: Expresión de LXR α y β en el colon del ratón. (a) Niveles de ARNm de LXR α y (b) LXR β en el extracto de colon de los ratones Wild-type (n=12) con respecto a los ratones IL-10^{-/-} (n=16). Se ha usado β -actina como gen de referencia. Se ha usado la prueba de Mann-Whitney.

Quisimos relacionar la disminución de LXR con las citocinas presentes en el colon de los ratones. Para ello se investigó la correlación entre los niveles de ARNm de ambas isoformas de LXR con los de diferentes citocinas pro-inflamatorias, que se muestran en la Figura 25. Se observó que los niveles de **IL-1 β** estaban significativamente relacionados de manera inversa tanto con los de LXR α como con los de LXR β . Sin embargo, la correlación con los valores de **TNF α** fue negativa para LXR α y positiva para LXR β , esta última no significativa.

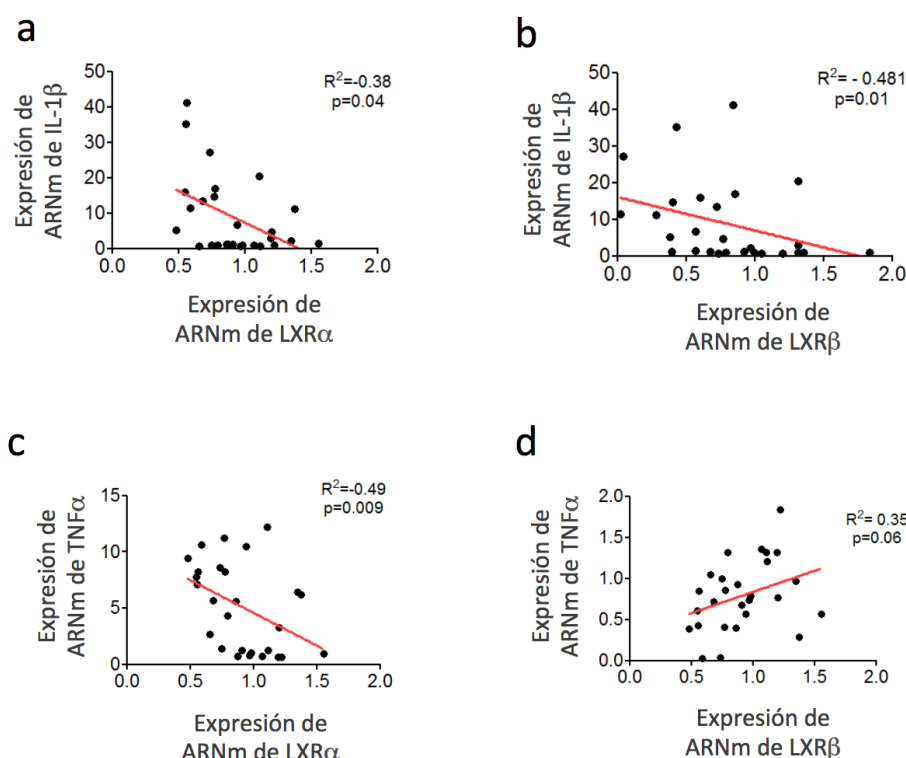


Figura 25: Correlaciones entre los niveles ARNm de (a) IL-1 β y LXR α ; (b) IL-1 β y LXR β , (c) TNF- α y LXR α ; (d) y TNF- α y LXR β del colon de los ratones WT y IL-10^{-/-} (n=27). Se utilizó la prueba de Spearman de correlación de variables cuantitativas.

7.3.2 Niveles de expresión de genes diana de LXR en el colon.

Para confirmar que la actividad de LXR estaba disminuida en los IL-10^{-/-} en los que se identificaba menor expresión génica de LXR se evaluó la expresión de sus genes diana. Se eligió **ABCA1** por su potencial antagonismo en la cascada inflamatoria, descrito en la introducción, y **FAS**. La expresión de ARNm de ambos genes estaba disminuida en los ratones IL-10^{-/-}. También se llevó a cabo la evaluación IHQ en el colon de ratones en el caso de ABCA1, que mostró una disminución de la tinción en el animal IL-10^{-/-}. Estos datos se muestran en la Figura 26, y confirman la disminución de la actividad de LXR en el colon de los ratones IL-10^{-/-}.

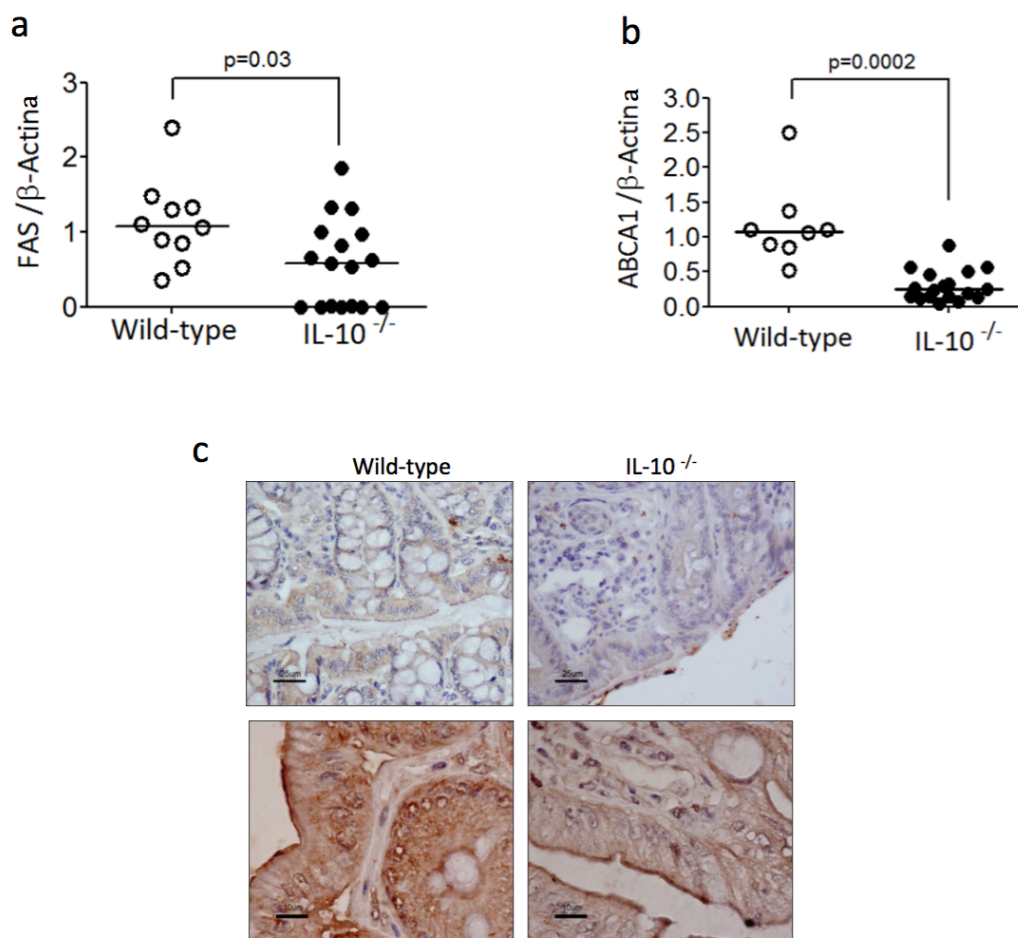


Figura 26: Comparación de los niveles de ARNm de (a) FAS y (b) ABCA-1 en el extracto de colon de los ratones IL-10^{-/-} con respecto a los ratones Wild-type. Se ha usado β -Actina como gen de referencia. Se ha utilizado la prueba de Mann-Whitney. (c) Imágenes representativas de la tinción IHQ de ABCA1 (1:25) en el ratón IL-10^{-/-} y en el Wild-type.

7.3.3 Tinción inmunohistoquímica de LXR en el colon del ratón.

Teniendo en cuenta que cuando LXR está activo se encuentra en el núcleo (199), el siguiente paso fue valorar la presencia nuclear de LXR $\alpha\beta$ y de sus dos isoformas por separado, α y β , en los cortes de colon de los animales tanto Wild-type ($n=3$ para cada una de las valoraciones) como IL-10^{-/-} ($n=6$ para LXR $\alpha\beta$, $n=4$ para LXR α y LXR β) mediante IHQ (Figuras 27 y 29). Se evaluó la positividad nuclear en las células del epitelio, las células no epiteliales y las totales.

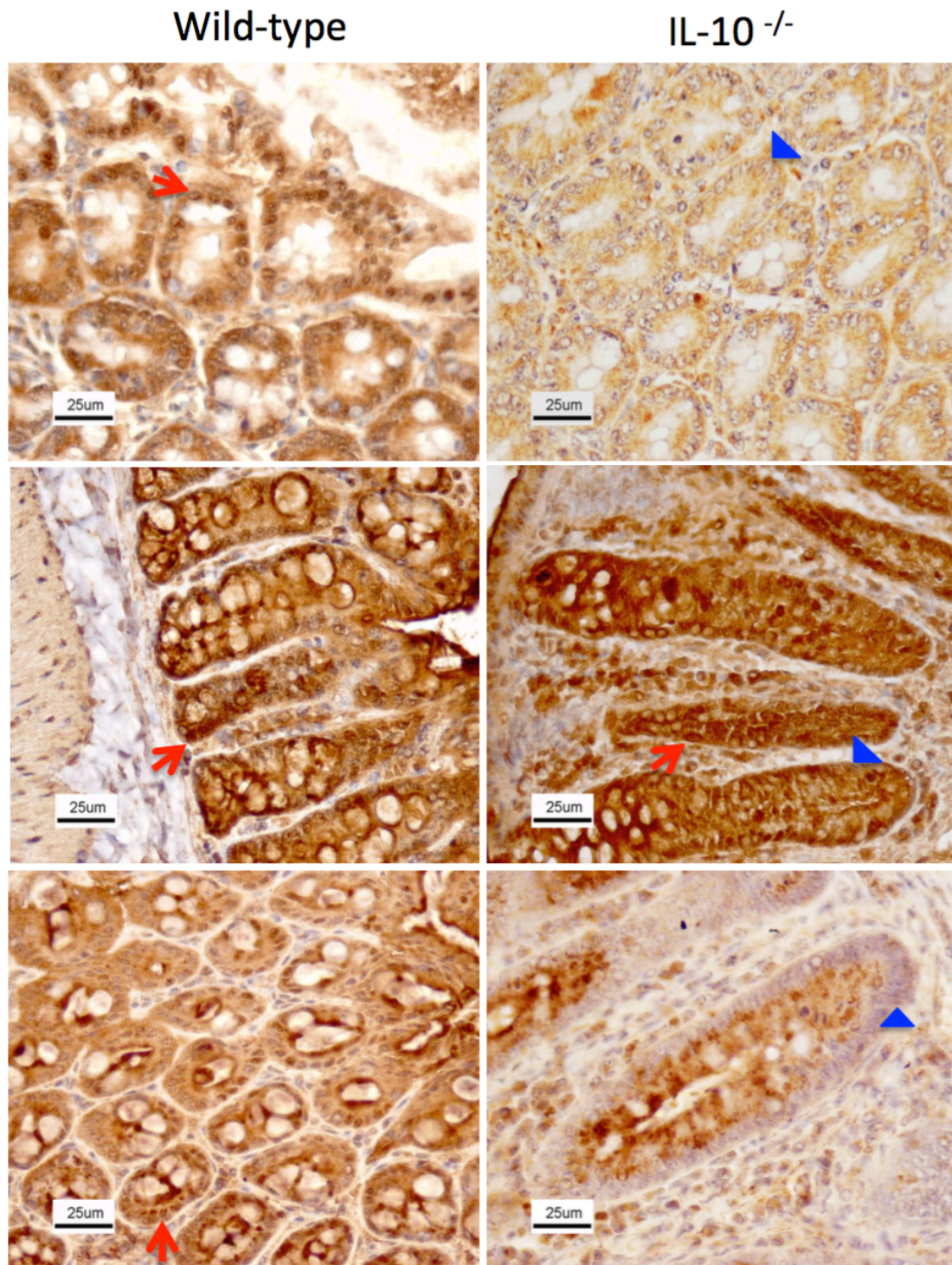


Figura 27: Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica para LXR $\alpha\beta$ (1:50) en colon de ratones control (izquierda) y de IL-10^{-/-} (derecha). Se muestran células con núcleo positivo (flecha roja) y células con núcleo negativo (punta de flecha azul).

Se observó una disminución de la tinción nuclear de **LXR $\alpha\beta$** en el colon de los animales IL-10^{-/-}. Además, se observó que esta diferencia era debida a un

menor número de núcleos positivos para LXR $\alpha\beta$ en el **epitelio** (p=0,0238). Este hecho no tuvo lugar en las células no epiteliales (p=0,38). Estos resultados se muestran en la Figura 28.

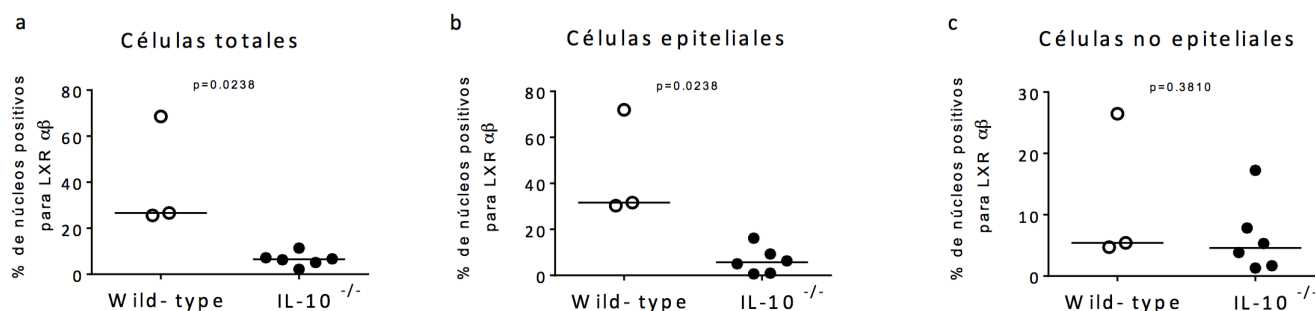


Figura 28: Contaje de núcleos positivos para LXR $\alpha\beta$ (a) en el total de las células (epiteliales y no epiteliales), (b) en las células epiteliales exclusivamente, (c) y en las no epiteliales exclusivamente del colon de ratones Wild-type (n=3) y ratones IL-10^{-/-} (n=6). Se ha utilizado la prueba de Mann-Whitney como método de comparación.

En paralelo, se tiñeron secciones de colon y se realizó una tinción IHQ para las isoformas LXR α y LXR β . En la Figura 29 se muestran imágenes representativas de ambas tinciones. La cuantificación de los núcleos positivos para la **isoforma α** no mostró diferencias cuando se cuantificaron de manera conjunta los núcleos epiteliales y no epiteliales, ni cuando se hizo por separado. Sin embargo, la cuantificación de los núcleos positivos para **LXR β** mostró una disminución en el colon de los ratones IL-10^{-/-} tanto en el contaje **global**, como en el contaje **epitelial**, sin encontrarse diferencias en el contaje no epitelial. Por lo tanto, la disminución del contaje de células positivas para **LXR $\alpha\beta$** a nivel epitelial era debida fundamentalmente a disminución de la **isoforma β** . Dichos resultados se muestran en la Figura 30.

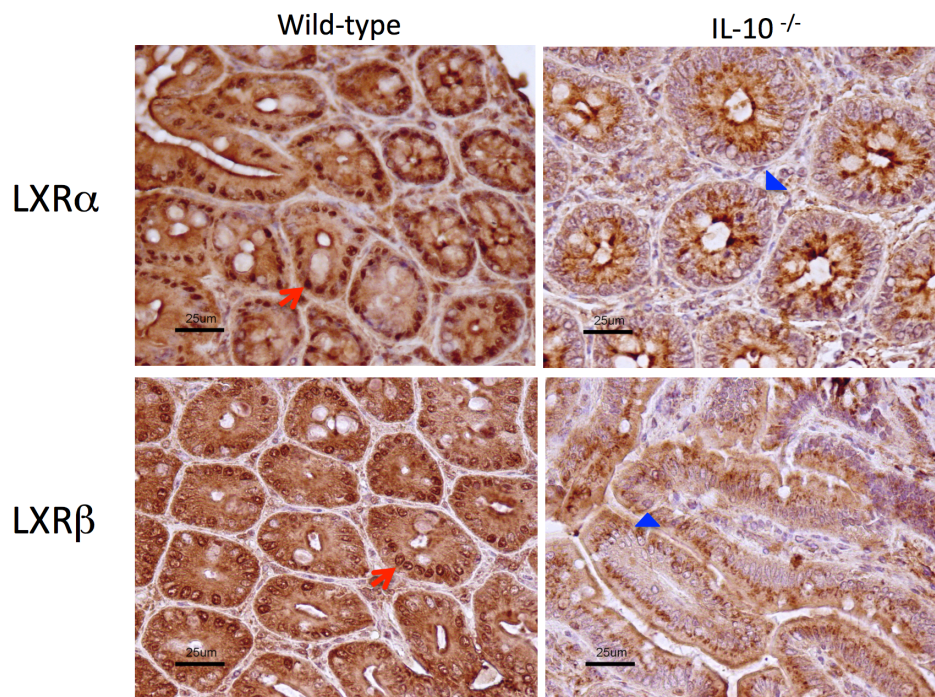


Figura 29: Imágenes representativas de la tinción para LXRα (1:50) y para LXRβ (1:50) en los dos grupos. Se muestran células con núcleo positivo (flecha roja) y células con núcleo negativo (punta de flecha azul).

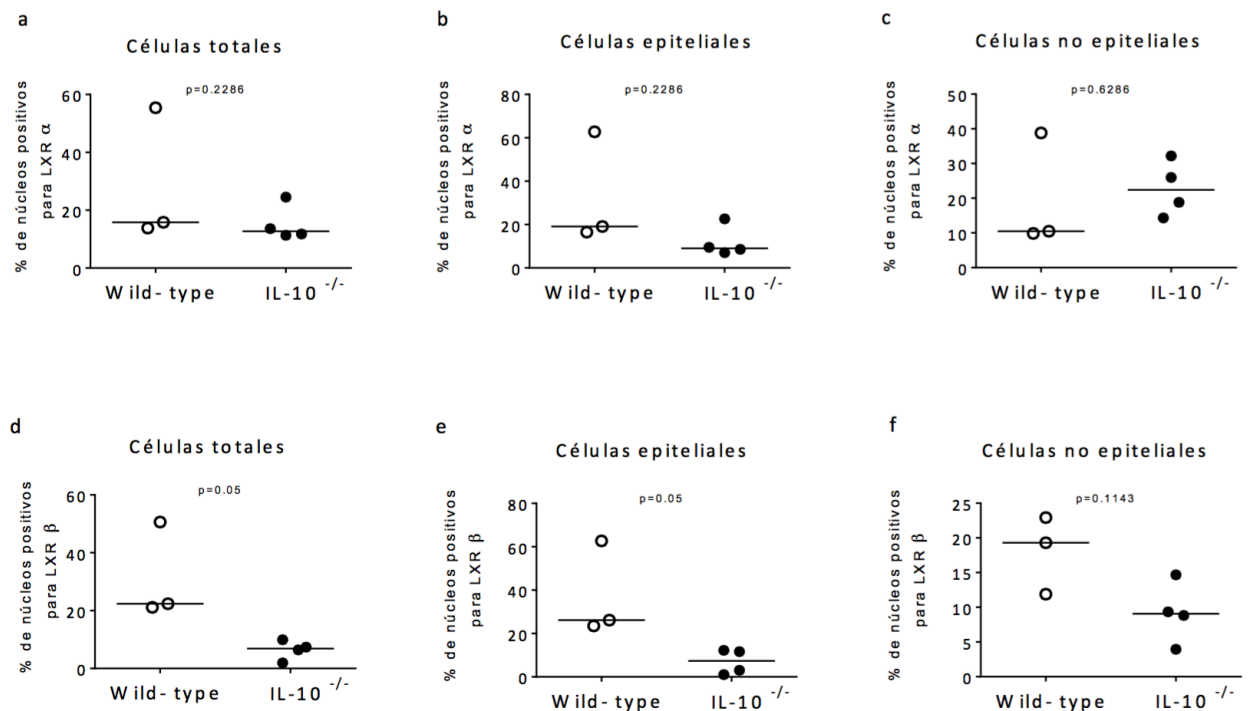


Figura 30: Contaje de núcleos positivos en el colon de los ratones para LXRα (1:50) (a) en el total de las células, (b) en las células epiteliales, (c) y en las no epiteliales del colon de ratones Wild-type (n=3) y ratones IL-10^{-/-} (n=4). Contaje del porcentaje de núcleos positivos para LXRβ (1:50) evaluado (d) en el total de las células, (e) en las células epiteliales, (f) y en las no epiteliales del colon de ratones Wild-type (n=3) y ratones IL-10^{-/-} (n=4). Se ha utilizado la prueba de Mann-Whitney como método de comparación.

7.3.4 Localización intracelular de LXR $\alpha\beta$

LXR está considerado un receptor nuclear tipo 2, que reside en el núcleo unido a RXR, al co-represor y a las secuencias de ADN que regulan sus genes diana; y por lo tanto se considera activo cuando se localiza a nivel nuclear (199). La evaluación IHQ utilizando un objetivo de 100 aumentos, reveló que la tinción para **LXR $\alpha\beta$** era principalmente nuclear en los animales Wild-type, y ello coincidía con disminución de la intensidad citoplasmática. En los animales IL-10^{-/-} la tinción mostraba un patrón de tinción inverso, se observó una disminución de la intensidad de LXR $\alpha\beta$ a nivel nuclear y un aumento en citoplasma. Se muestran dichos hallazgos en la Figura 31.

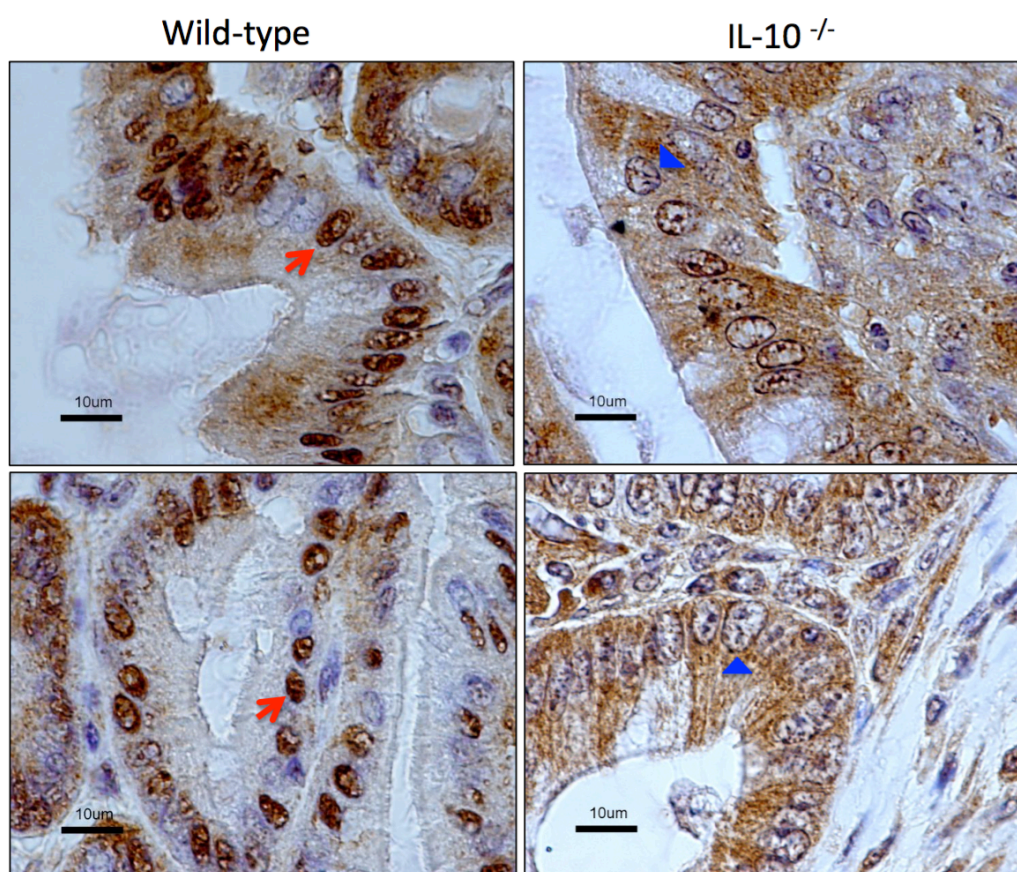


Figura 31: Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica de LXR $\alpha\beta$ (1:50, 100 aumentos) de colon de ratones Wild-type y ratones IL-10^{-/-}. Se muestran células con núcleos positivos y citoplasma negativo (flecha roja) y células con núcleo negativo y citoplasma positivo (punta de flecha azul).

Así mismo, se valoró la presencia nuclear de las isoformas de LXR α y β en el colon de los ratones IL-10^{-/-} y de los Wild-type, cuyas imágenes representativas se muestran en la Figura 32. Se observó que el comportamiento de las isoformas por separado era similar al de LXR $\alpha\beta$, con menor tinción citoplasmática cuando hay positividad nuclear y a la inversa.

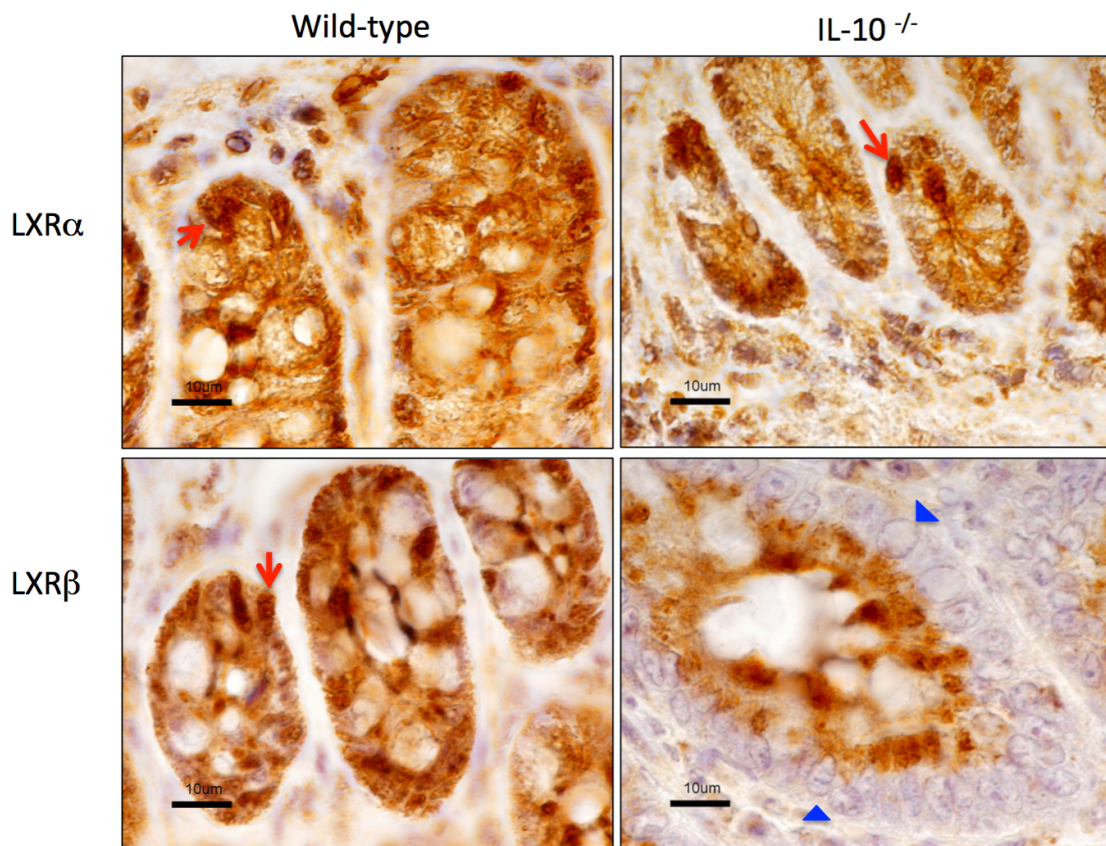


Figura 32: Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica de LXR α y LXR β (1:50, 100 aumentos) de colon de ratones Wild-type y ratones IL-10^{-/-}. Se muestran células con núcleos positivos y citoplasma negativo (flecha roja) y células con núcleo negativo y citoplasma positivo (punta de flecha azul).

7.4 Efecto de la IL-1 β sobre LXR en cultivos celulares.

7.4.1 Efecto de la estimulación con IL-1 β sobre citocinas y quimiocinas de producción epitelial, sobre LXR $\alpha\beta$ y ABCA1.

Con el objetivo de establecer un modelo de inflamación en la célula epitelial intestinal se simuló un ambiente pro-inflamatorio estimulando las células Caco-2 con IL-1 β (25 ng/mL) durante 3, 6 y 24 horas (4, 200, 201). A continuación se determinaron los niveles de ARNm de las citocinas IL-6 e IL-8, y las quimiocinas CCL-25 y CCL-28. Como muestra la Figura 33, los niveles de IL-8 y CCL-28 aumentaron de manera significativa a las 6 horas de estimulación, mientras que IL-6 y CCL-25 no presentaron cambios con respecto a las células no estimuladas.

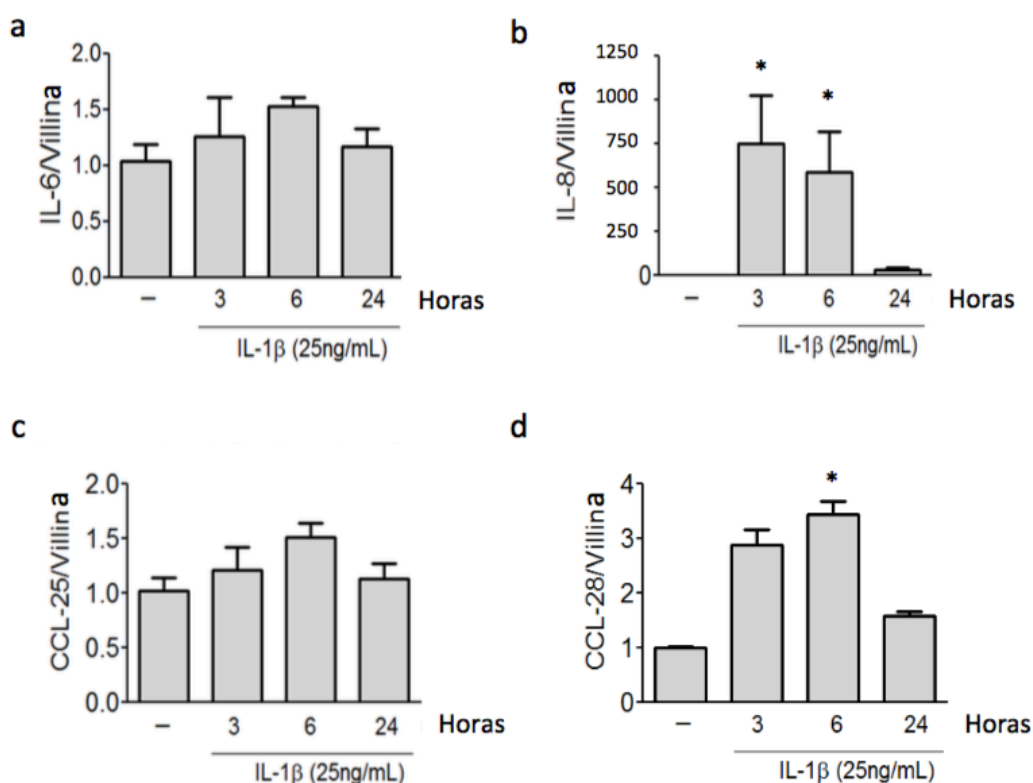


Figura 33: Niveles de expresión de ARNm de (a) IL-6, (b) IL-8, (c) CCL-25, (d) y CCL-28 en células Caco-2 (n=3) después de la estimulación con IL-1 β (25 ng/mL) durante 3, 6 y 24 horas. Se ha usado vilina como gen de referencia. Se ha utilizado la prueba de Mann-Whitney como método de comparación. Se considera significativo (*) p<0,05, comparación con respecto a vehículo.

En paralelo, se midieron los niveles de expresión del ARNm de LXR α y β , y no se observaron cambios (Figura 34). Sin embargo, se observó una disminución significativa de los niveles de expresión de **ABCA1** a las 6 horas de estimulación con IL-1 β (Figura 34). Por todo ello, se utilizó el tiempo de estimulación con IL-1 β de 6 horas para la evaluación de la expresión de ARNm en los experimentos celulares de posteriores.

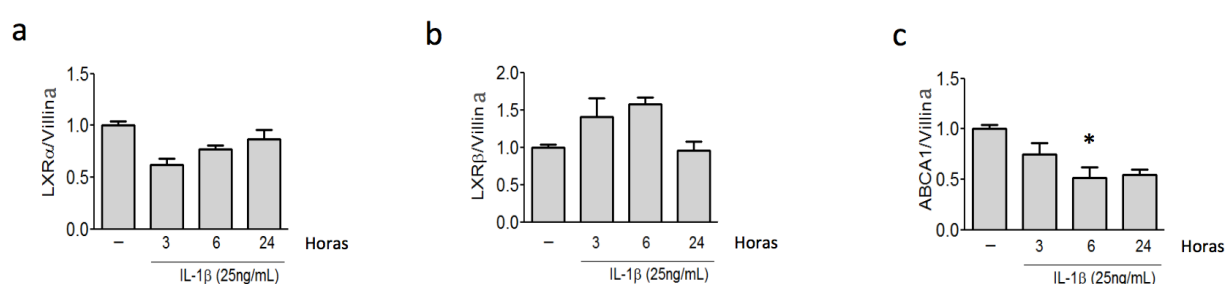


Figura 34: Niveles de expresión de ARNm de (a) LXR α , (b) LXR β , (c) y ABCA-1 en células Caco-2 (n=3) después de la estimulación con IL-1 β (25 ng/mL) durante 3, 6 y 24 horas. Se ha usado vilina como gen de referencia. Se ha utilizado el test de Mann-Whitney como método de comparación. Se considera significativo (*) p<0,05, comparación con respecto a vehículo.

7.5 Efecto del agonista de LXR GW3965 sobre la inflamación epitelial.

Una vez sugerida la potencial relevancia de LXR en la mucosa inflamada en pacientes con EII, identificado el epitelio como principal fuente de cambio en un modelo animal de ileocolitis, y establecidas las condiciones experimentales en los cultivos celulares nos propusimos evaluar el papel anti-inflamatorio del eje LXR/ABCA1/colesterol en el epitelio intestinal utilizando como referencia los datos y experimentos publicados en macrófagos.

7.5.1 Efecto de GW3965 sobre LXR y sus genes diana en células Caco-2.

En primer lugar se determinó la concentración del agonista de LXR GW3965 capaz de inducir la expresión de ABCA1, uno de los genes diana de LXR, en células Caco-2 en cultivo y analizar los patrones de expresión de diferentes moléculas. A concentraciones crecientes (0,5; 1 y 2 μM) se observó que la incubación con GW3965 durante 18 horas aumentó de manera dosis-dependiente los niveles de expresión **ABCA1**. Por ello utilizamos la dosis de 2 μM en experimentos subsiguientes. Se evaluó también el efecto de la estimulación con GW3965 sobre los niveles de ARNm de **LXR α** y **β** , sin observar cambios. Dichos resultados se muestran en la Figura 35.

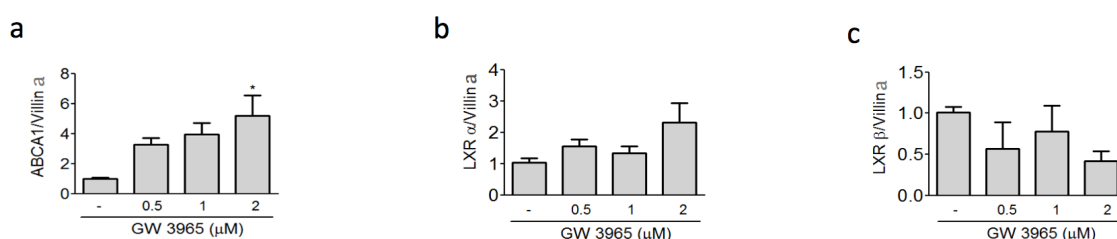


Figura 35: Niveles de expresión del ARNm de (a) ABCA1, (b) LXR α (c) y LXR β en células Caco-2 tras 18 horas de incubación con concentraciones crecientes del agonista LXR GW3965 (n=4). Se utilizó vilina como gen de referencia. Se ha utilizado la prueba de Mann-Whitney como método de comparación. Se considera significativo (*) $p < 0,05$, comparación con respecto al vehículo.

7.5.2 Efecto de la pre-incubación de células Caco-2 con GW3965 sobre las quimiocinas IL-8 y CCL-28 en cultivos estimulados con IL-1 β .

A continuación evaluamos la capacidad del agonista de LXR de revertir un ambiente inflamatorio generado por la IL-1 β sobre células Caco-2. Para ello se pretrataron las células Caco-2 con GW3965 y vehículo durante 18 horas y posteriormente se estimularon con IL-1 β durante 6 horas para evaluar el ARNm y

durante 24 horas para la evaluación proteica del medio de cultivo. Se observó que el aumento de CCL-28 y de IL-8 generado por la estimulación con IL-1 β se revertía en las células tratadas con GW3965 tanto por qPCR en el extracto celular como por ELISA en el medio de cultivo. Este experimento consiguió demostrar el efecto anti-inflamatorio de la activación de LXR en el epitelio intestinal en cultivo. Los resultados se representan en la Figura 36.

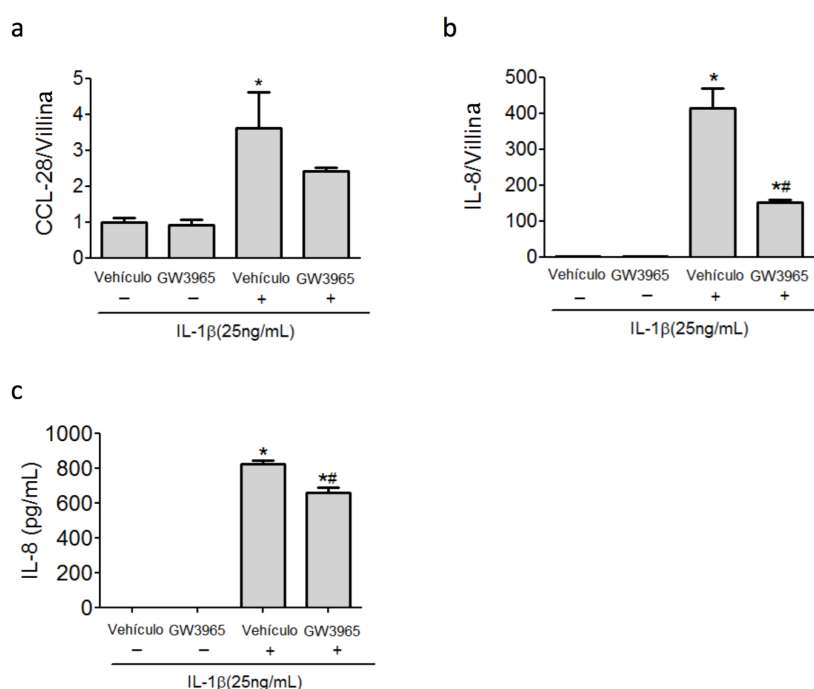


Figura 36: Efecto del tratamiento con GW3965 sobre células Caco-2 estimuladas con IL-1 β . **(a)** Niveles de expresión de ARNm de CCL-28, **(b)** e IL-8 en células Caco-2 pre-incubadas (18 horas) con vehículo (DMSO) o con GW3965 (2 μ M) y posteriormente estimuladas con IL-1 β (25ng/mL) durante 6 horas (n=8). Se ha usado vilina como gen de referencia. **(c)** Concentración de IL-8 en sobrenadante del medio de cultivo de células Caco-2 medida por ELISA tras incubación durante 18 horas con vehículo (DMSO) o con GW3965 (2 μ M) y posteriormente estimuladas con IL-1 β (25ng/mL) durante 24 horas (n=6). Se ha utilizado la prueba de Mann-Whitney como método de comparación. Se considera significativo (*diferencia con respecto a grupo de vehículo; #diferencia con respecto a IL-1 β + vehículo) p<0,05.

7.5.3 Efecto del tratamiento con GW3965 sobre la ruta NF- κ B

Para conocer el mecanismo por el cual LXR tiene un efecto anti-inflamatorio se evaluaron las rutas de señalización intracelular de las MAP quinasas p44-42 y de NF- κ B, ambas vías efectoras del receptor de IL-1/TLR y con gran relevancia en

la cascada inflamatoria. La activación de la ruta de **NF- κ B** se caracteriza por el paso de su subunidad p65 al núcleo celular para iniciar la transcripción de genes pro-inflamatorios. Se realizó una IFI sobre células Caco-2 pretratadas con GW3965 durante 18 horas, tras lo cual se añadió IL-1 β (25 ng/mL) al medio de cultivo durante 30 minutos, y se cuantificó la fluorescencia nuclear para p65 utilizando microscopía confocal. Se muestran los hallazgos en la Figura 37.

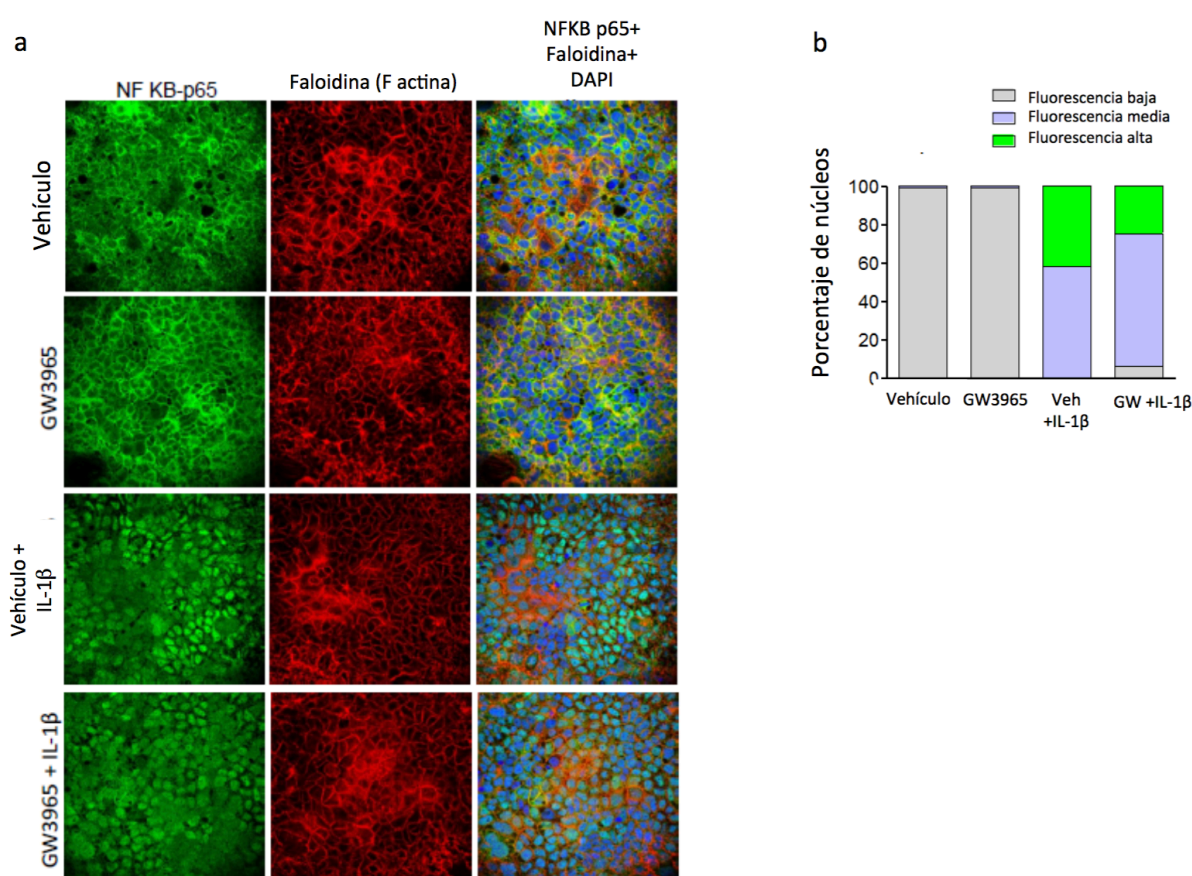


Figura 37: Estudio de la vía de NF- κ B tras pretratamiento con GW3965 en células Caco-2 estimuladas con IL-1 β . **(a)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia de la tinción de la subunidad p65 de NF- κ B (1:200), F-actina (1:40) y las imágenes superpuestas con los núcleos teñidos con DAPI (1:500) en células Caco-2 pre-incubadas (18 horas) con vehículo (DMSO) o con GW3965 (2 μ M) y posteriormente estimuladas con IL-1 β (25ng/mL) durante 30 minutos (n=6). **(b)** Representación del conteo de los núcleos en función de su nivel de fluorescencia (alta: mayor de 125 unidades arbitrarias de fluorescencia, media: entre 75 y 125 unidades, y baja: menor de 75 unidades) a partir de la IFI de p65 en células Caco-2 pre-incubadas (18 horas) con vehículo (DMSO) o con GW3965 (2 μ M) y posteriormente estimuladas con IL-1 β (25ng/mL) durante 30 minutos (n=6).

Se observó una disminución de la positividad tras la estimulación con IL-1 β en las células pretratadas con GW3965, sugiriendo una reducción la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B.

7.5.4 Efecto del GW3965 sobre la activación de MAP quinasas p44-42

La evaluación de la activación de la vía de las **MAP quinasas** se realizó cuantificando la proporción de la forma fosforilada (activada) de p44-42 -también llamada ERK- con respecto a la forma no fosforilada. Se pre-trataron las células Caco-2 con GW3965 y posteriormente se estimularon con IL-1 β durante 10 minutos. La activación de p44-42 tras la estimulación con IL-1 β , medida como su fracción fosforilada entre la no fosforilada, fue menor en las células tratadas con GW3965. Se muestran los resultados en la Figura 38.

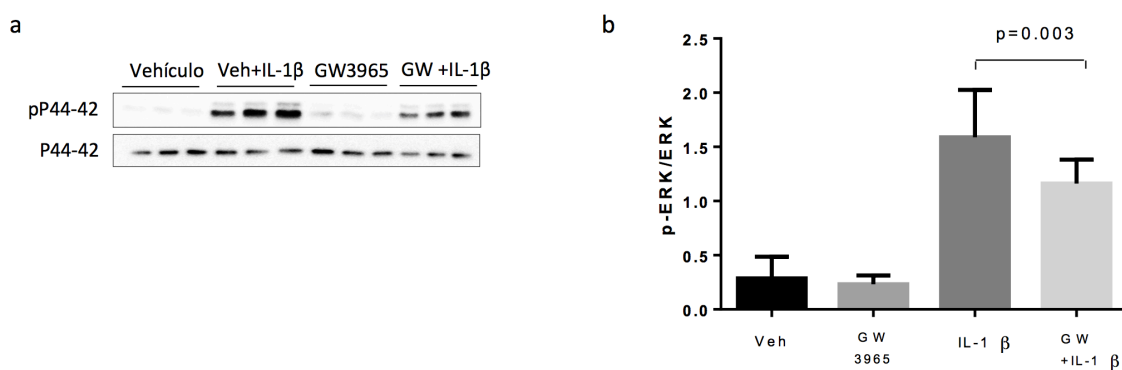


Figura 38: Estudio de la vía de MAP quinasas tras pretratamiento con GW3965 en células Caco-2 estimuladas con IL-1 β . **(a)** Imagen representativa de Western blot para las MAP quinasas P44-42 en su forma fosforilada (1:1000) y no fosforilada (1:1000) en células Caco-2 pre-incubadas (18 horas) con vehículo (DMSO) o con GW3965 (2 μ M) y posteriormente estimuladas con IL-1 β (25ng/mL) durante 10 minutos (n=11). **(b)** Valores densitométricos de los western blot correspondientes al cociente entre la forma fosforilada y la no fosforilada de P44-42. Se ha utilizado la prueba de Tukey como método de comparación.

7.6 Papel mediador de ABCA1 sobre el efecto anti-inflamatorio de GW3965 y sobre la vía AKT relacionada con la degeneración neoplásica.

7.6.1 Efecto del bloqueo farmacológico de ABCA1 con glibenclamida sobre el efecto anti-inflamatorio de GW3965

La molécula **ABCA1**, diana de LXR, ha sido relacionada con una actividad anti-inflamatoria en estudios en macrófagos; además es una molécula presente y con gran importancia en el epitelio intestinal ya que regula el nivel de colesterol intracelular de los enterocitos. Con objetivo de valorar su importancia como molécula efectora de la acción anti-inflamatoria de LXR utilizamos un antagonista farmacológico de ABCA1, la **glibenclamida** (202). La administración de glibenclamida durante 6 horas contrarrestó la disminución de la activación de las **MAP quinasas p44-42** condicionada por GW3965 en células Caco-2 estimuladas con IL-1 β durante 10 minutos, medido por western blot del extracto proteico. Se muestra el resultado en la Figura 39.

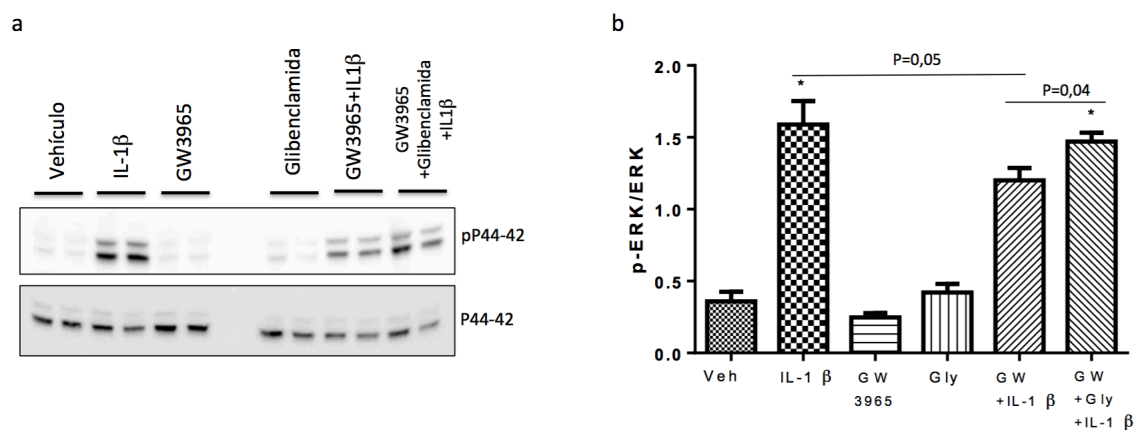


Figura 39: Efecto del bloqueo de ABCA1 con glibenclamida sobre la vía de las MAP quinasas en células Caco-2 pre-tratadas con GW3965 y estimuladas con IL-1 β . (a) Western blot para las MAP quinasas P44-42 en su forma fosforilada (1:1000) y no fosforilada (1:1000) en células Caco-2 pre-incubadas (18 horas) con vehículo (DMSO) o con GW3965 (2 μ M), glibenclamida 0,5 mM durante 6 horas y posteriormente estimuladas con IL-1 β (25ng/mL) durante 10 minutos (n=8). (b) Valores densitométricos de los western blot correspondientes al cociente entre la forma fosforilada y la no fosforilada de p44-42. La significación entre condiciones se realizó con la prueba de t de student.

7.6.2 Efecto del bloqueo farmacológico de ABCA1 con glibenclamida sobre el efecto anti-proliferativo de GW3965

Para confirmar la importancia de ABCA1 también en la degeneración neoplásica decidimos estudiar la ruta de **AKT** en presencia de un agonista de LXR y de un inhibidor farmacológico de ABCA1, ya que se ha demostrado que la activación de LXR disminuye la ruta de AKT (161). La administración de glibenclamida contrarrestó la disminución de la activación de vía de AKT por GW3965 en células Caco-2 estimuladas con IL-1 β . El resultado se muestra en la Figura 40.

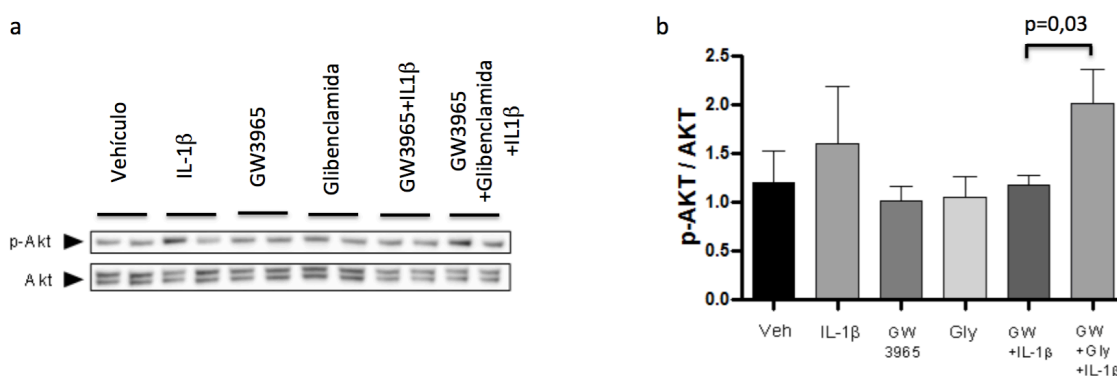


Figura 40: Efecto del bloqueo de ABCA1 con glibenclamida sobre la vía de AKT en células Caco-2 pre-tratadas con GW3965 y estimuladas con IL-1 β . (a) Western blot para AKT en su forma fosforilada (1:1000) y no fosforilada (1:1000) en células Caco-2 pre-incubadas (18 horas) con vehículo (DMSO) o con GW3965 (2 μ M), glibenclamida 0,5 mM durante 6 horas y posteriormente estimuladas con IL-1 β (25ng/mL) durante 10 minutos (n=6). (b) Valores densitométricos de los western blot correspondientes al cociente entre la forma fosforilada y la no fosforilada de AKT. La significación entre condiciones se realizó con la prueba t de student.

8 DISCUSIÓN

Pertinencia de la realización de la presente tesis

El conocimiento de la patogenia de la EII es incompleto, y actualmente se considera que la inflamación intestinal ocurre en individuos genéticamente predispuestos y está marcadamente influida por la composición de la microbiota intestinal, estando ambos aspectos en creciente estudio. Sin embargo, ni el genoma o ni el microbioma por sí solos, ni en conjunto, parecen condicionar la aparición y la persistencia de la enfermedad. En cambio, esta parece ser el resultado de la interacción de múltiples factores – cuya caracterización está en progreso – que dan lugar a una inflamación epitelial sostenida en el tiempo, debida a la activación de la respuesta inmune innata y la adaptativa, sobre todo por el desequilibrio de la respuesta pro-inflamatoria de las células Th1, Th2 y Th17 y la respuesta anti-inflamatoria de las células T reguladoras (203). Sin duda, el conocimiento preciso de los mecanismos asociados con el origen y el mantenimiento de la respuesta inflamatoria inapropiada es crítico para una mejor comprensión de la EII y especialmente, para el diagnóstico y tratamiento de la misma. Por ello, el estudio de los receptores nucleares, implicados en la modulación de la transcripción de múltiples genes, puede ayudar a aportar luz sobre la **etiopatogenia de la EII**. Para ello, un abordaje que combine el estudio en muestras de origen humano combinado con el estudio en el modelo animal de ileocolitis crónica genética como el de los ratones IL-10^{-/-} así como los cultivos de células epiteliales de intestino utilizado en esta tesis, es muy apropiado.

El diagnóstico de la EC y de la CU se basa en los criterios de Lennard-Jones, publicados en 1989 (41). Desde ese momento se ha avanzado mucho en el

conocimiento de la enfermedad, pero sigue habiendo dificultades para establecer el diagnóstico certero. No existen características patognomónicas radiológicas, ni clínicas ni histológicas de la EII ni de cada uno de sus subtipos. En este sentido, el estudio de moléculas relacionadas con la inflamación subyacente y que potencialmente permitiesen **establecer un diagnóstico** en una misma biopsia endoscópica de colon sería de gran interés. LXR se postula como una opción válida dado que su expresión puede cuantificarse en una biopsia endoscópica, y que además pudiera ser diferente en los sujetos sanos y en los pacientes con EII, si bien hasta el momento no ha mostrado especificidad. Una línea futura de investigación será el análisis de la expresión de LXR en otras enfermedades inflamatorias como la diverticulitis aguda o la colitis infecciosa.

Por otra parte, y a pesar del creciente número de pacientes diagnosticados de EII y la investigación clínica llevada a cabo en numerosas unidades, no se han identificado marcadores moleculares que ayuden a predecir de manera certera la evolución de los pacientes. De hecho, es evidente la existencia de una marcada incertidumbre tanto a corto como a medio plazo. El epitelio, sin duda con un papel crucial, representa posiblemente el punto de partida de la actividad inflamatoria. Por ello, la medición de una molécula con implicación en la biología de la enfermedad podría tener un **valor predictivo** acerca de la evolución futura en términos de extensión y gravedad de la inflamación, respuesta a tratamientos y aparición de complicaciones. Un biomarcador con estas características sería obviamente útil a nivel de los segmentos endoscópicamente inflamados, pero quizá también en los segmentos de colon no inflamados o indemnes, donde la actividad inflamatoria puede estar ausente o ser de muy bajo grado desde el punto de vista endoscópico e incluso histológico. En este sentido es posible que la información

más relevante pueda estar a nivel molecular, siendo este tipo de biomarcadores candidatos apropiados para su detección. A modo de ejemplo, existen estudios que han sugerido que la activación de iNOS en el segmento indemne puede predecir la progresión proximal de la CU en los siguientes dos años (47).

Además, el establecimiento de objetivos terapéuticos más allá de la mejoría clínica del paciente está cobrando cada vez más importancia. La estrategia de “tratamiento hacia el objetivo” (“*treat to target*” en inglés) busca proponer un objetivo concreto y medible de la enfermedad -la curación mucosa o la curación histológica- para prevenir complicaciones a largo plazo (204). En este sentido sería interesante disponer de una molécula relacionada con la inflamación que representase a nivel molecular la activación de las vías inflamatorias epiteliales. Una línea de investigación futura podría ser comprobar tanto en la mucosa inflamada como en la indemne si la **curación bioquímica**, es decir la normalización el grado de positividad de LXR en la tinción IHQ, se relaciona con la intensidad o la extensión de la enfermedad.

Otro aspecto de gran importancia en los pacientes con EII con afectación de colon es la posibilidad de degeneración maligna. LXR puede tener una actividad anti-proliferativa (205) y su estudio puede ser interesante para **estimar el riesgo de degeneración maligna**, y así poder plantear estrategias diferentes en el manejo de los pacientes. Un ejemplo puede ser acortar los intervalos entre las colonoscopias de seguimiento, o terapéuticas como la intensificación de tratamiento o incluso la indicación de cirugía. Así mismo, el conocimiento de los mecanismos implicados en la degeneración maligna, como por ejemplo la contribución de la vía AKT de apoptosis, y el reconocimiento del gen o genes diana relacionados con dicha actividad, pueden facilitar el desarrollo de nuevos estudios

en el futuro. En este sentido es importante destacar que la distribución de LXR en el núcleo o en el citoplasma tiene relevancia a la hora de predecir la actividad anti-proliferativa (206) por lo que evaluar la **localización intracelular de LXR** puede añadir valor a los estudios.

Por otro lado, no se ha estudiado la expresión de LXR y sus genes diana en el colon del **modelo animal de ratones IL-10^{-/-}**. Además, se desconoce si ambas **isoformas** de LXR tienen presencia en el colon inflamado de los ratones IL-10^{-/-}, y si su distribución es fundamentalmente epitelial.

Además de lo expuesto anteriormente, existen importantes lagunas en el tratamiento médico de la EII, que está centrado en bloquear diferentes moléculas efectoras en las vías de la inflamación. El bloqueo de TNF α ha constituido una revolución en el tratamiento de estos pacientes, evitando cirugías y mejorando su calidad de vida (48). El bloqueo de la subunidad p40 de las IL-12 e IL-23, y de la integrina $\alpha 4\beta 7$ intestinal son los mecanismos de acción de nuevas moléculas aceptadas para el tratamiento de la EII que también han obtenido resultados satisfactorios y son parte del arsenal terapéutico disponible en estos pacientes. Sin embargo, las estrategias para disminuir la inmunogenicidad y los ajustes de dosis no evitan que haya una pérdida de respuesta considerable, que puede alcanzar incluso el 12% anual en un estudio con infliximab en EC (207). Además, un 50-80% de los pacientes con enfermedad de Crohn (208), y un 30% con colitis ulcerosa requerirán una cirugía de resección intestinal a lo largo de su vida (209). Por ello, la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en los pacientes con EII es considerada prioritaria. La vía de LXR/ABCA1 en el epitelio podría constituir una **diana anti-inflamatoria con potencial uso en la EII**, teniendo en cuenta el efecto

anti-inflamatorio observado en CEI, que previamente había sido evidenciado en el macrófago. Además, la existencia de agonistas que actúen sobre el epitelio intestinal sin tener actividad sistémica puede permitir dirigir el efecto del agonista sobre la célula y el tejido diana, con la posibilidad de minimizar los potenciales efectos adversos de la administración sistémica.

En este contexto el conocimiento del mecanismo de este potencial efecto anti-inflamatorio de LXR en el colon es esencial. Algunos estudios sugieren que ABCA1 puede ser la molécula diana de LXR responsable del efecto anti-inflamatorio (178), si bien esto se ha demostrado en el macrófago y no en el epitelio intestinal. Además, identificar la **molécula efectora** responsable del efecto anti-inflamatorio de LXR puede dirigir estudios futuros hacia una terapia más efectiva o más selectiva.

A pesar de lo anteriormente comentado, el receptor LXR ha sido poco estudiado en el contexto de la EII, principalmente en modelos químicos de la enfermedad -la administración de DSS oral y de TNBS rectal-, y también en el modelo “inflamatorio sistémico” de LPS intraperitoneal, y se pudo observar que los ratones deficientes en LXR tenían peor evolución, y que la administración de un agonista a los ratones salvajes condicionó una menor pérdida de peso y una disminución de las moléculas inflamatorias en el colon (171, 172). En células epiteliales en cultivo también se observaron resultados positivos, ya que la administración del agonista de LXR disminuyó la expresión génica de marcadores inflamatorios tras la incubación con TNF α y LPS. Sin embargo, no existen estudios relacionados con LXR en modelos crónicos de enterocolitis como es el caso de los ratones IL-10^{-/-}, posiblemente el más representativo de la enfermedad humana.

Finalmente, el efecto beneficioso de LXR en otros sistemas más allá de la inmunidad es bien conocido. LXR está implicado en el transporte reverso de colesterol en los macrófagos y en el epitelio del intestino delgado, protege contra la obesidad inducida por la dieta, aumenta la sensibilidad a la insulina y desciende los niveles de glucosa y mantiene varias funciones neuronales (128). Sin embargo, se ha visto que la activación de LXR provoca acciones lipogénicas, secreción de partículas de VLDL ricas en triglicéridos y la aparición de hígado graso en el ratón, hecho que parece mediado por SREBP-1c y FAS (210). No obstante, este efecto adverso pudiera evitarse por medio del uso de un agonista intestino-específico (GW6340) (141) o usando el agonista DMHCA, que activa LXR sin aumentar los triglicéridos en el hígado (211).

LXR se expresa de manera diferente en el colon de los pacientes con y sin enfermedad inflamatoria intestinal.

La presente tesis describe una menor expresión de LXR en la mucosa de los pacientes con EII en comparación con los pacientes control. Así mismo, su expresión epitelial en la mucosa endoscópicamente inflamada de los pacientes con EII es menor comparado con los segmentos indemnes. La cuantificación de los núcleos positivos para LXR $\alpha\beta$ se correlacionó de manera significativa con variables clínicas e histológicas relevantes. En el segmento **inflamado** se correlacionó negativamente con el índice histológico de inflamación y con la edad, mientras que en el segmento **indemne** presentó correlación negativa con el índice de Mayo parcial y con el total. Estos hallazgos profundizan en la relación de LXR con la inflamación de colon, y indican que LXR podría ser una pieza importante en

la regulación de la inflamación en los pacientes con EII. El desequilibrio de esta vía, manifestado como pérdida de expresión o de función podría condicionar la aparición, la persistencia o el empeoramiento de la enfermedad. No se ha medido la expresión de LXR en las colonoscopias subsiguientes, si bien es posible que los cambios en la cuantificación de LXR a lo largo del tiempo aporten aun más información sobre el valor de este receptor.

Además, podría existir una aplicación práctica del conteo de LXR en el epitelio del colon de los pacientes, más allá de arrojar luz sobre la patogenia de la EII, pudiendo ser informativo a la hora de **predecir** la evolución de los pacientes. Se postula por ejemplo que el conteo en el segmento inflamado se relacione con el empeoramiento clínico, mientras que en el segmento indemne podría predecir por ejemplo la progresión proximal en el colon. Estas cuestiones, sin duda de interés, no han podido ser valoradas de manera certera en esta tesis porque las variables clínicas y endoscópicas de seguimiento de los pacientes estaban poco representadas. Cabe destacar así mismo que los pacientes incluidos estaban en su mayoría en una situación clínica bien controlada, con índices de actividad clínica bajos y sin corticoterapia sistémica, y la representación de EC de colon o CI era menor. Puede que el comportamiento en estas subpoblaciones sea diferente.

La inflamación histológica es un parámetro especialmente importante en los pacientes con EII con afectación de colon, debido a su conocida relación con el pronóstico de los mismos. Se ha estudiado más en los pacientes con CU dentro del contexto de la estrategia *"treat to target"*, y se ha relacionado con el riesgo de padecer un CCR (212). Así mismo la ausencia de dicha inflamación histológica disminuye el riesgo de recurrencia clínica, necesidad de corticoides y de hospitalización (213, 214). Nuestro estudio confirma, como otros habían hecho

previamente (215), que la mucosa aparentemente no inflamada presenta **inflamación histológica**. Por ello cobra importancia así mismo el estudio de los segmentos indemnes endoscópicamente, que además expresan menos LXR y esto se relaciona de manera inversa con el índice de Mayo.

Un aspecto que aporta solidez a esta tesis es que los resultados de la expresión de LXR se reproducen en el análisis de colon del humano, del ratón y en CEI en cultivo, y son congruentes con lo descrito en la literatura. Los estudios hasta ahora publicados de **presencia de LXR en el colon** humano son escasos. Se ha demostrado que la expresión génica de LXR α y β medida por qPCR está disminuida en el colon inflamado de pacientes con EC y CU con respecto a pacientes control (171, 216). El conteo nuclear por IHQ llevado a cabo en esta tesis no se había utilizado para valorar LXR en contexto de inflamación, si bien Courtaut *et al* lo utilizaron para el estudio de la degeneración neoplásica. Observaron en muestras humanas de cáncer de colon que el número de núcleos positivos para LXR β era menor comparado con muestras de mucosa normal adyacente al tumor, si bien no describen si se contabiliza el epitelio o incluyen también las células subepiteliales (206). Nuestro estudio confirma la menor positividad para LXR en pacientes con EII, y la centra en el **epitelio** y concretamente en el núcleo celular. En relación con esto último, se ha demostrado que la **localización intracelular** es de especial relevancia ya que cuando LXR está dentro del núcleo está ejerciendo su función (199), aumenta su actividad transcripcional (217), y puede ser determinante en el efecto de un agonista de LXR (206), por lo que la detección de LXR a este nivel por IHQ es especialmente pertinente. Así, en nuestro estudio la valoración a gran aumento permitió identificar que en el segmento indemne la tinción de LXR es nuclear y el citoplasma

presenta un nivel de tinción bajo, mientras que en el segmento inflamado la ausencia de tinción nuclear habitualmente va acompañada de un aumento de la tinción citoplasmática. LXR está considerado un receptor nuclear tipo 2, que tras sintetizarse pasa al núcleo y permanece unido a RXR, al co-represor y a las secuencias de ADN que regulan sus genes diana, y permanece en el núcleo esté o no unido a su agonista (199). Los hallazgos de esta tesis sugieren que existe un **tráfico** de LXR al citoplasma, hallazgo que había sido descrito previamente para otros receptores nucleares (218, 219). No obstante, es posible que exista una permanencia **selectiva** de LXR α y LXR β en el núcleo, y esto permita la activación de las vías dependientes de una u otra isoforma. De hecho, en estudios de permeabilidad en cultivos de células renales embrionarias Prufer *et al* demostraron que la localización citoplasmática puede ocurrir cuando LXR α está unido a un ligando y cuando LXR β no se encuentra unido a un ligando, mientras que los encontramos en el núcleo cuando LXR α no está unido a un ligando y cuando LXR β sí lo está (199). En esta tesis se ha valorado esta cuestión en el ratón y es la isoforma β la que tiene menos presencia nuclear en el epitelio del ratón IL-10 $^{-/-}$, mientras que la isoforma α no parece participar en este tráfico.

Esta ausencia de localización nuclear y la subsiguiente falta de función de LXR puede tener implicaciones en la **patogenia** de la EII. En esta dirección también apunta el hecho de que la expresión de LXR en el colon sea diferente en pacientes con EII y controles, y también entre los segmentos inflamados y los indemnes, pudiendo constituir LXR uno de los elementos clave que subyace al inicio de la inflamación. En este sentido, la disminución de la expresión de LXR en el epitelio intestinal –demostrada en esta tesis en las biopsias de colon– puede condicionar una reducción de su actividad transcripcional y por tanto generar un desequilibrio

que favorezca las vías pro-inflamatorias. Además, se ha demostrado que hay una menor expresión de FAS y SERBP1, ambos genes diana de LXR, en biopsias de colon de pacientes con EII (216), y que esto podría condicionar una disminución de fosfatidil-colina en el moco rectal de pacientes con colitis ulcerosa (220) y una alteración de la función de barrera intestinal (221). En el inicio de este proceso puede estar la **microbiota**, así como la predisposición genética ya comentada previamente. La flora bacteriana del colon sano produce ácidos grasos de cadena corta (SCFA) como butirato, propionato y acetato durante el proceso de fermentación de carbohidratos, los cuales son fundamentales en el control de la homeostasis de la célula epitelial intestinal, participando en el control de los procesos de proliferación celular, inflamación y carcinogénesis (222). En concreto, el butirato ejerce su actividad anti-inflamatoria a través de la inhibición de la vía de NF- κ B (223), y ha demostrado efecto beneficioso en modelos animales de colitis (224) y en pacientes con CU (225). Los SCFA aumentan la actividad de la AMP-protein quinasa activada y la del coactivador 1 α de PPAR- γ (226), el cual controla la transcripción de LXR entre otros receptores nucleares (227). Por ello, en situaciones patológicas con una marcada alteración de la microbiota comensal y la disminución de la producción de SCFA puede propiciar una reducción en los niveles de expresión de LXR y su función transcripcional anti-inflamatoria, como ocurre con otros receptores nucleares como PPAR- γ y el receptor de vitamina D (228). Además, la activación de TLR 3 y 4 por ligandos microbianos inhibe la inducción de los genes diana de LXR sin modificar la cantidad de LXR α y β (167), lo cual constituye un posible mecanismo sinérgico que puede promover la cascada inflamatoria epitelial.

En esta tesis se ha utilizado la valoración cuantitativa de las tinciones por IHQ, y esto ha permitido poner el foco sobre el **epitelio** como elemento activo en la inflamación de la mucosa del colon. De hecho, una de las posibles explicaciones de la discrepancia existente entre los resultados del análisis IHQ y los obtenidos mediante western blot –no se observa una disminución de la cantidad de LXR $\alpha\beta$ en el segmento inflamado con respecto al indemne– es que las biopsias endoscópicas incluyen mucosa (epitelio, lámina *propria* y *muscularis* mucosa) además de submucosa en algunas ocasiones, de forma que al obtener el extracto proteico no se puede distinguir entre epitelio y el resto de componentes de la mucosa; de hecho, de manera consistente se observa una alta positividad para las tinciones de LXR en la lámina *propria*, lugar de residencia principal de los macrófagos, monocitos y leucocitos.

El modelo de ratones deficientes en interleucina 10 es apropiado para valorar la enfermedad inflamatoria intestinal.

Indudablemente, la necesidad de constatar los hallazgos y confirmar las especulaciones previamente comentadas requiere un modelo animal apropiado. En este sentido, el modelo de ratones IL-10^{-/-} utilizado en la presente tesis cumple con los requisitos fenotípicos deseados. De hecho, los animales IL-10^{-/-} tenían en el momento del sacrificio un mayor grado de edema tisular comparado con los ratones Wild-type. Además, tanto el índice histológico de Kim como la presencia de las moléculas de inflamación en el colon de los ratones IL-10^{-/-}, salvo CCL-28, estaban aumentados. Esta última quimiocina se expresa de manera constitutiva en el humano en las mucosas de colon, traquea, glándula mamaria y saliva e intestino (229), y está aumentada en las biopsias de colon inflamado de pacientes con CU y

en CEI en cultivo tras estimulación con IL-1 α (104). En el ratón se expresa en el colon así como en las glándulas parótidas, riñón y cerebro (230). Sin embargo, no hay datos en la literatura acerca de los cambios de CCL-28 en el colon de los ratones IL-10 $^{-/-}$, ni acerca de la regulación de la IL-10 sobre esta quimiocina. Además, la expresión génica en el ratón IL-10 $^{-/-}$ se valoró en el extracto de todo el espesor del colon, no sólo en el epitelio, lo cual puede también influir en este resultado. Por último, se han valorado los animales en las semana 18-20 de edad, y es posible que exista un aumento más tardío de la expresión de CL-28.

Desde el punto de vista de los mecanismos de la enfermedad, se ha podido constatar un aumento de tinción IHQ nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B, y una disminución de E-cadherina –tanto en su expresión génica como en la tinción proteica con inmunofluorescencia en tejido– y Zo-1. En esta línea, la IL-10 juega un papel importante regulando la activación epitelial de NF- κ B inducida por bacterias (231). De hecho, el desarrollo de la colitis del raton IL-10 $^{-/-}$ requiere activación de TLR por bacterias con posterior activación de la vía de NF- κ B (59), y requiere la presencia de MyD88 en los monocitos (61).

Los datos comentados corroboran estudios de la literatura en los cuales los ratones **IL-10 $^{-/-}$** son considerados como un modelo animal de EII. A nuestro juicio es un modelo más representativo de la enfermedad en humanos comparado con los modelos químicos ya que es crónico, –y por tanto puede seguirse a lo largo del tiempo y además permite la realización de estudios sobre la historia natural de la enfermedad–, las alteraciones histológicas son similares a las observadas en el humano y su gravedad no es tan intensa como la de otros modelos químicos. La edad de 18-20 semanas parece adecuada para evaluar la inflamación cólica, como nuestro grupo ha publicado previamente (4).

Sin embargo, el papel de LXR no había sido estudiado previamente en el ratón IL-10^{-/-}.

La expresión de LXR y sus genes diana está disminuida en el colon del ratón deficiente en IL-10

En la presente tesis hemos abordado el estudio de la implicación de LXR en el colon de los ratones por IHQ, diferenciando la positividad epitelial y no epitelial, con el objetivo de investigar el **papel de LXR en el epitelio** del colon. Dicha tinción mostró que el porcentaje de núcleos positivos para LXR $\alpha\beta$ estaba significativamente disminuido en los animales IL-10^{-/-}, y que esta disminución tenía lugar en el epitelio y a expensas de LXR β . Así mismo, la expresión molecular de LXR α y β en el colon de los ratones IL-10^{-/-} fue menor que en el ratón Wild-type, así como la expresión de sus genes diana ABCA1 y FAS. En este sentido, estudios previos muestran que la IL-10 aumenta la excreción de colesterol en macrófagos cargados de lípidos por un aumento de la expresión de ABCA1 y ABCG1, y observaron que la activación de LXR potenció este efecto por medio del aumento de la expresión del receptor de IL-10 (232). También se ha demostrado previamente que ambas isoformas de LXR se expresan en el colon (233), si bien **LXR β** se ha relacionado con la actividad anti-inflamatoria (170, 171) y anti-proliferativa (164) en este órgano. Por otro lado, la valoración a gran aumento permitió observar un comportamiento equiparable al del colon humano y que sugiere un **tráfico núcleo-citoplasmático de LXR**: las células epiteliales del modelo de ileocolitis presentan habitualmente ausencia de positividad nuclear para LXR $\alpha\beta$, pero a este hecho le acompaña la positividad citoplasmática. Este hecho también se ha demostrado para LXR α y β . Teniendo además en cuenta los

datos comentados previamente sobre la presencia citoplasmática de LXR –puede ocurrir cuando LXR β no se encuentra unido a un ligando– es probable que la ausencia nuclear de LXR $\alpha\beta$, y por lo tanto de LXR β se deba a que no está unido a un ligando y por lo tanto no esté ejerciendo su función anti-inflamatoria sobre la transcripción, representando un posible motivo del origen y la perpetuación de la inflamación epitelial.

LXR ha sido muy estudiado en el macrófago, que indudablemente tiene importancia en la EII, pero cuyo protagonismo debe ser compartido con la célula epitelial. Los resultados de esta tesis sugieren un papel relevante de LXR, y fundamentalmente de LXR β en el control de las rutas inflamatorias en el epitelio del colon, y por ello nuestro estudio se complementa con el uso de los cultivos de una línea celular de epitelio intestinal para los experimentos relativos al mecanismo y función de este receptor.

La IL-1 β activa la secreción de quimiocinas en el epitelio en cultivo y disminuye la expresión de ABCA1

La IL-1 β es secretada por monocitos y macrófagos estimulados en el tejido dañado y activa la cascada inflamatoria y el daño tisular junto a otras citocinas (234), siendo uno de los mediadores clave en la inflamación mucosa que ocurre en la EII (94). Su unión al receptor de IL-1 activa la cascada de señalización de NF- κ B que desencadena el aumento de la producción de otros mediadores proinflamatorios como TNF, IL-6 e IL-12 (235), así como promueve la migración de neutrófilos (236). De hecho, la activación de este receptor desencadena una vía de señalización compartida con la de la activación de TLR, importante mediador de la respuesta inmune tras interaccionar con PAMPS y actor fundamental en la

etiopatogenia de la EII, por lo cual la utilización de IL-1 β nos pareció especialmente pertinente. Además, ciertas líneas celulares entre las que se encuentran Caco-2, utilizada en esta tesis, no responden de manera homogénea a otros estímulos pro-inflamatorios como LPS (237). Llamativamente, se ha descrito en macrófagos que la activación de TLR inhibe la función de transcripción de LXR (167), y de hecho también se ha descrito ese mismo efecto con el estímulo con IL-1 β (168), aspecto que se ha comprobado en esta tesis observando un descenso de ABCA1 tras la administración de IL-1 β . Este efecto no había sido demostrado en CEI en cultivo. La IL-1 β está aumentada en el colon inflamado de los pacientes con EII y en modelos animales (238-240), y parece tener una importancia crucial en el desarrollo de la inflamación intestinal. De hecho, la administración de un bloqueante del receptor de IL-1 β ha conseguido mejorar algunos modelos agudos de inflamación intestinal (241). Nuestros datos demuestran que las células Caco-2 estimuladas con IL-1 β son un modelo válido de inflamación de la CEI observándose un incremento de IL-8 y CCL-28. En contraste con los hallazgos en el colon del ratón, CCL-28 presentó un aumento tras la estimulación con IL-1 β , efecto que había sido descrito previamente en líneas celulares de colon en cultivo y asociado al menos en parte con la vía de NF- κ B (104), no así tras la estimulación con TNF- α , IFN- γ o IL-6. Por otro lado, otro estudio con células Caco-2 demostró que la sobreexpresión de mediadores pro-inflamatorios tras la estimulación con IL1- β estaba mediada por la activación de NADPH oxidasa, aumento de las especies reactivas de oxígeno y consecuente activación de la vía de NF- κ B (242). Por último, el efecto de la IL-1 β sobre la cantidad total de LXR es variable en la literatura. En esta tesis no se observaron cambios significativos en la expresión de LXR α y β , si

bien un estudio previo en células tubulares renales mostró una disminución de la expresión génica de LXR α sin alterar la de LXR β (243).

La activación de LXR tiene un efecto anti-inflamatorio mediado por p44-42 MAP quinasas y NF- κ B

Estudios previos han mostrado el efecto anti-inflamatorio de LXR (165, 166, 170), si bien en general se han centrado en el macrófago como célula efectora. Esta célula esencial en la respuesta inmune innata y la respuesta inflamatoria reside a nivel intestinal en la lámina *propria*. Nuestro objetivo fundamental ha sido valorar el efecto a nivel del **epitelio intestinal**. Así, la administración de GW3965 condicionó una disminución de la expresión de IL-8 y CCL-28 en CEI en cultivo, y de la fracción proteica de IL-8 en el medio de cultivo.

El mecanismo de este efecto anti-inflamatorio puede ser explicado al menos en parte por la modulación de la ruta de NF- κ B. En esta tesis la estimulación de las células Caco-2 con IL-1 β condicionó la activación de la vía de **NF- κ B** con el paso de su subunidad p65 al núcleo de las CEI, y se observó que el pre-tratamiento con GW3965 disminuyó la traslocación nuclear de p65. La expresión de NF- κ B está fuertemente aumentada en los macrófagos y las células epiteliales del intestino de los pacientes con EII, se acompaña de secreción de TNF α , IL-1 e IL-6 (244), y se correlaciona con la severidad de la inflamación (245). Por otro lado, también hemos demostrado que la estimulación con IL-1 β condiciona fosforilación de las **MAP quinasas** p44-42, y el pre-tratamiento con GW3965 disminuyó dicha fosforilación. Se ha visto que la expresión de las MAP quinasas p44-42 está aumentada en los colonocitos y las células de la lámina *propria* de pacientes con EII, y su fosforilación está aumentada en las fases activas de la EII (246).

Ambas rutas son especialmente importantes en el desarrollo y perpetuación de la actividad inflamatoria en la EII (247, 248) y por ello la activación de LXR puede representar una pertinente opción terapéutica en esta enfermedad.

ABCA1 tiene un papel mediador en el efecto anti-inflamatorio y anti-proliferativo de LXR

Se ha demostrado en estudios previos en CEI de colon así como en macrófagos y en células epiteliales pulmonares una disminución de ABCA1 tras la estimulación con moléculas pro-inflamatorias como IL-1 β (168, 187) o TNF α (186). Se postula que dicha acción podría estar mediada por la vía de LXR, o directamente por NF- κ B, aunque no hay consenso sobre ello (187). Así mismo, ABCA1 parece una molécula clave en la cascada inflamatoria acontecida en los macrófagos (177, 178), ya que la ausencia de expresión de ABCA1 condicionó un aumento de las citocinas pro-inflamatorias, y también la pérdida del efecto beneficioso del agonista de LXR. Esta importancia en la actividad anti-inflamatoria de ABCA1 se debe al menos en parte a la capacidad de disminuir el contenido de colesterol y la migración de los TLR hacia las **balsas lipídicas**, con posterior disminución de NF- κ B y TNF- α (181, 183). La célula epitelial es un elemento de gran relevancia en el transporte reverso de colesterol, junto con el macrófago. En esta tesis utilizamos la glibenclamida como inhibidor farmacológico para valorar la importancia de ABCA1. La atenuación de la fosforilación de p44-42 en presencia de IL-1 β condicionada por GW3965 se vio inhibida por el uso de glibenclamida. Este resultado sugiere la dependencia al menos parcial de ABCA1 en el efecto anti-inflamatorio del agonista de LXR, si bien estos datos debieran complementarse con otros métodos de inhibición como siRNA para ABCA1 o la realización de

experimentos específicos en el ratón ABCA1^{-/-}. La contribución de ABCA1 en el **efecto anti-inflamatorio** de la ruta de LXR en el epitelio intestinal no había sido valorada previamente. Sin embargo un estudio en células epiteliales respiratorias estimuladas con LPS sugiere que el efecto anti-inflamatorio de la estimulación de LXR α con platicodina se debe a la disminución de la migración de TLR-4 a las balsas lipídicas por depleción de colesterol mediada por el eje LXR-ABCA1 (182). La siguiente Figura 41 muestra la propuesta de funcionamiento de la vía anti-inflamatoria LXR-ABCA1:

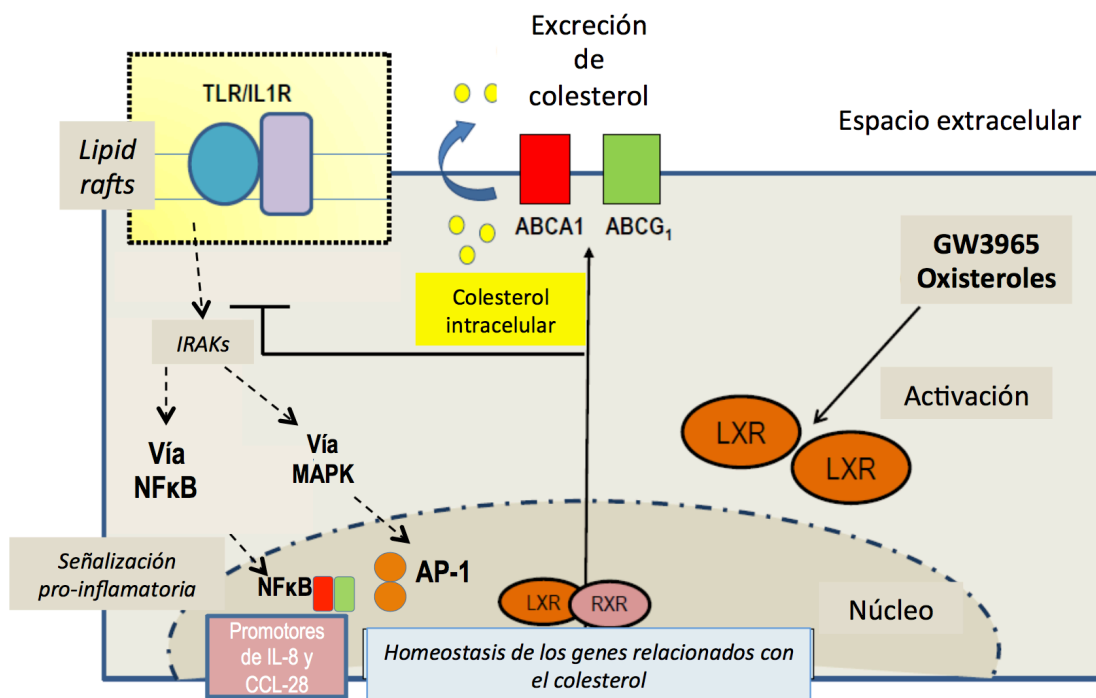


Figura 41: Esquema de la interacción entre la vía de señalización de LXR, el metabolismo lipídico y las citocinas pro-inflamatorias. La activación de LXR por los oxisteroles y por GW3965 condiciona aumento de la transcripción de sus genes dianas, entre ellos ABCA1 y ABCG1, relacionados con la excreción de colesterol. La disminución del colesterol condiciona cambios en los *lipid rafts* o balsas lipídicas, que disminuyen la activación de los receptores TLR-4 e IL1R, disminuyendo la activación de la vía de NF-κB y de las MAP quinasas.

Por otro lado, se ha demostrado que la activación de LXR tiene efectos anti-proliferativos en varias líneas celulares de cáncer de próstata, mama, glioblastoma, melanoma, vesícula biliar y colon (159, 162, 205, 249). Además, en el cáncer de

colon este efecto de LXR parece mediado por LXR β por medio de la piroptosis por aumento de caspasa-1 (164). Por todo ello quisimos valorar la importancia de ABCA1 en el **efecto anti-proliferativo** de LXR, y se observó que la atenuación de la fosforilación de AKT con GW3965 desaparece también con el uso de glibenclamida. El desarrollo de cáncer de colon en los pacientes con CU tiene una incidencia anual de aproximadamente 1/500-1600 pacientes al año (250), está ligado a la extensión de la inflamación del colon (251) y a la severidad histológica de la misma (252), y nace del epitelio. Las estrategias actuales de prevención y diagnóstico precoz se basan en las colonoscopias periódicas con toma de biopsias aleatorias por segmentos en los casos en los que no se observen lesiones sospechosas. En otro orden de cosas, la forma fosforilada de AKT fosforila e inactiva a la quinasa supresora de tumores GSK-3 β , regulando la supervivencia, ciclo y crecimiento celulares. Las mutaciones de AKT que activan en exceso dicha vía han sido identificadas en el cáncer de mama, colorectal y de ovario (253). Se ha visto que esta vía está sobre-expresada en el cáncer colorectal asociado a colitis (254). En esta tesis el conteo de LXR en las biopsias humanas del segmento inflamado se relaciona inversamente con la inflamación histológica y con la edad, ambos factores que pueden condicionar aumento del riesgo de degeneración neoplásica de la mucosa. La ausencia de pacientes con cáncer de colon o displasia en esta cohorte impide hacer valoraciones pronósticas a este respecto, sin embargo parece prometedor el estudio de la cuantificación de LXR en el segmento inflamado y su relación con aparición futura de cáncer o displasia. Por otro lado, el efecto anti-proliferativo de LXR en el epitelio intestinal está mediado al menos parcialmente por ABCA1, hallazgo no conocido previamente.

La Figura 42 muestra nuestra propuesta de funcionamiento de la ruta LXR-ABCA1 en el epitelio intestinal tanto en condiciones de homeostasis como en condiciones de inflamación.

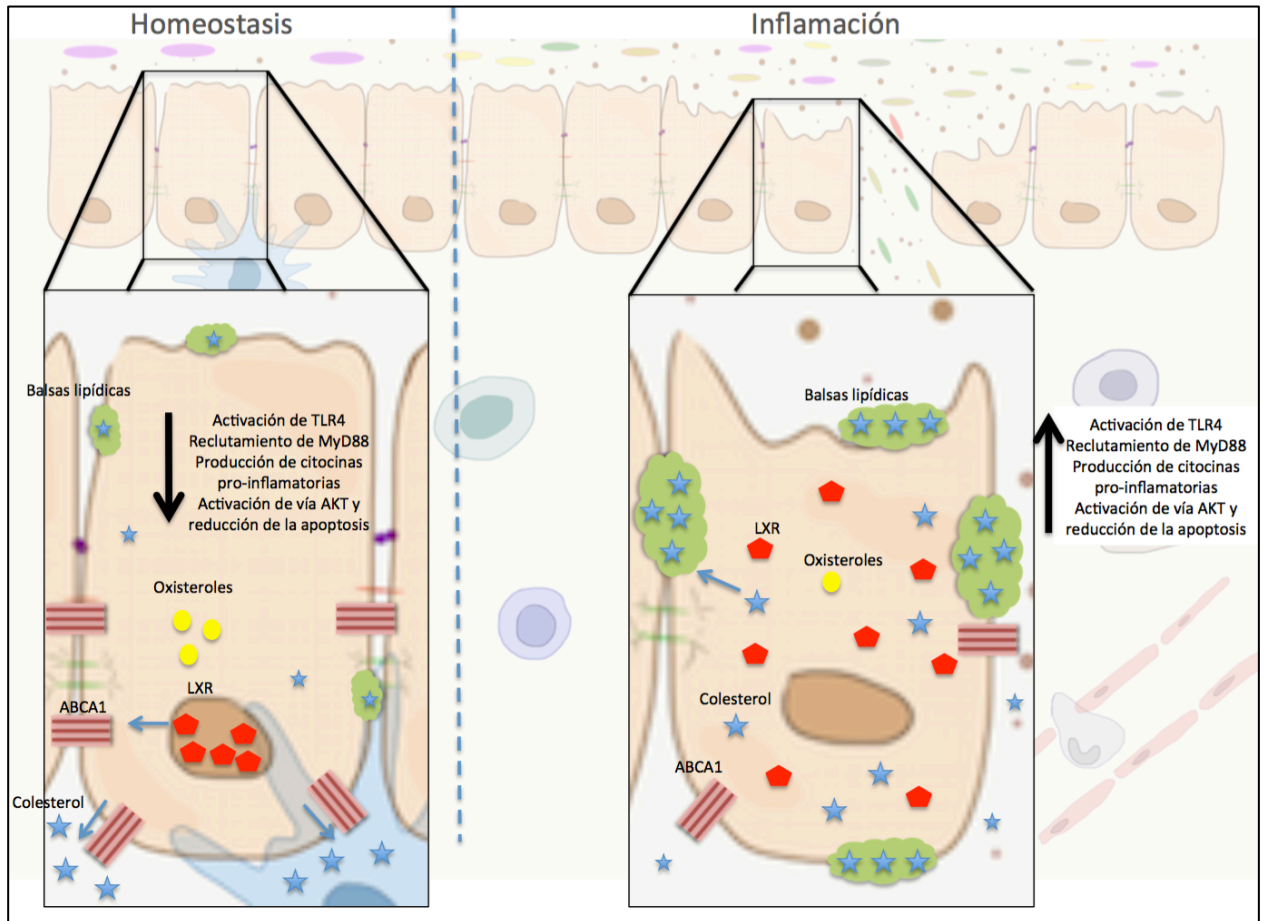


Figura 42: Funcionamiento de la ruta LXR-ABCA1 en el epitelio intestinal tanto en condiciones de homeostasis como en condiciones de inflamación. En situación de equilibrio los oxisteroles sintetizados en la célula epitelial intestinal activan a LXR que inicia la transcripción de genes, entre ellos ABCA1. El aumento de producción de ABCA1 aumenta la excreción de colesterol, disminuyendo el colesterol de las balsas lipídicas por lo que hay menos activación/migración de TLR4, menos reclutamiento de MyD88, menor producción de citocinas proinflamatorias y menos activación de la ruta de AKT y mantenimiento de la apoptosis. En el contexto de la inflamación epitelial la reducción de LXR, de su localización nuclear o de los oxisteroles disminuye la activación de LXR y la transcripción de sus genes diana, incluido ABCA1. Esto condiciona un aumento del colesterol intracelular, mayor saturación de colesterol de las balsas lipídicas y con ello aumento de la activación de TLR4, del reclutamiento de MyD88, de la producción de citocinas proinflamatorias y de la activación de la ruta de AKT y consecuentemente una menor activación de la apoptosis y mayor potencial de degeneración neoplásica.

En la Figura 43 se propone una teoría sobre la etiopatogenia de la EII que implica la ruta LXR-ABCA1.

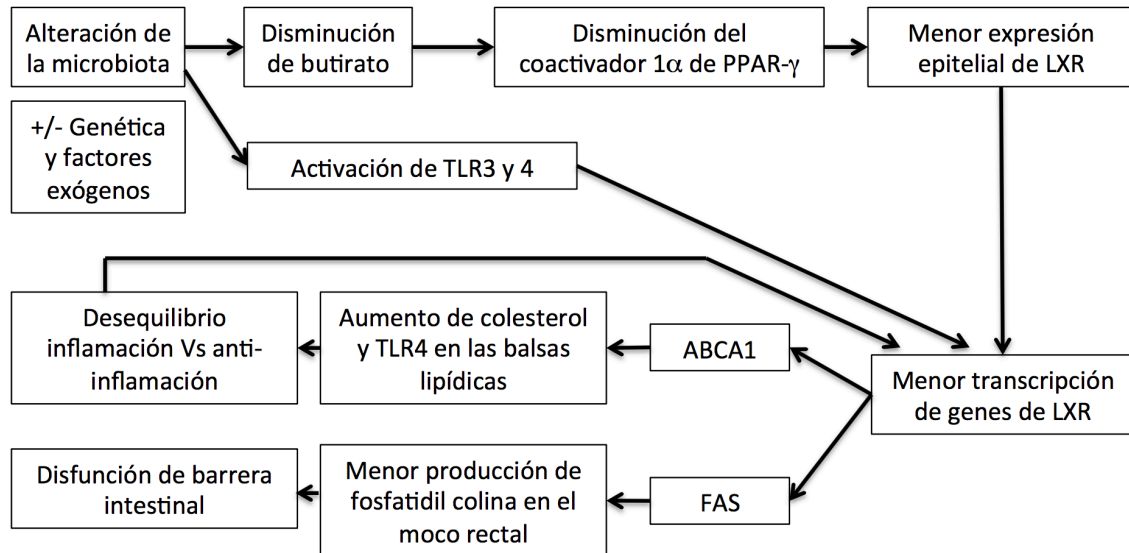


Figura 43: Teoría etiopatogénica de la EII implicando a la ruta LXR-ABCA1.

Puntos fuertes y débiles generales. Perspectivas futuras

Como **puntos fuertes** del presente estudio cabe destacar su **carácter traslacional**, comprobando la similitud de los hallazgos entre las biopsias de colon humanas de pacientes, el modelo murino de ileocolitis genética y los cultivos celulares con estimulación con citocinas. Cada una de las tres aproximaciones permite extraer conclusiones sólidas y complementarse. El estudio en biopsias humanas muestra las diferencias en LXR debido a que se utiliza como **control** tanto biopsias de colon de pacientes sin enfermedad como de un segmento de colon indemne del propio paciente, con lo que aumenta la validez interna del estudio. Si bien existen múltiples modelos animales, se ha decidido la utilización del **modelo de IL-10^{-/-}** debido a su mayor similitud con el humano. Esto da más

validez translacional al estudio con ratones. Hemos utilizado **técnicas novedosas**, como el conteo nuclear en la IHQ de ratones identificando los diferentes compartimentos del corte, lo cual ha permitido centrar el estudio en el epitelio. Existen otras patologías en las que la valoración IHQ y el conteo de células positivas tiene un gran valor diagnóstico en la práctica clínica habitual como el conteo de linfocitos intra-epiteliales en la enfermedad celíaca por medio de la IHQ CD3+ (255), o el conteo de los eosinófilos intra-epiteliales en la esofagitis eosinofílica (256).

Como **puntos débiles** cabe destacar, en primer lugar, que el **pequeño tamaño muestral** del estudio en humanos ha impedido relacionar los niveles de LXR con variables **pronósticas** que no estaban casi representadas en nuestra serie como son las hospitalizaciones, la necesidad de cirugía o de intensificar el tratamiento, la presencia de displasia y la aparición de CCR en el seguimiento, hecho posiblemente relacionado con que la mayoría de los pacientes estaban en remisión clínica. Este aspecto, unido a que no se incluyeron pacientes con inflamación epitelial diferente a la EII como la colitis infecciosa o la diverticulitis aguda y que no se ha llevado a cabo un estudio de rendimiento diagnóstico han impedido extraer conclusiones sólidas acerca de la utilidad de LXR en el **diagnóstico** de la EII. Así mismo, la representación de los subtipos de EII en la valoración por IHQ no ha sido homogénea ya que la CU era predominante (6 de 7 pacientes incluidos). Por otro lado, el estudio del efecto **anti-proliferativo** de LXR requiere ampliar la valoración hacia otras vías de apoptosis, así como su implicación en otras situaciones como la displasia y el cáncer.

El presente trabajo ha explorado a fondo la relación entre LXR y el proceso inflamatorio ocurrido en el colon de pacientes con EII, en el ratón IL-10^{-/-} y en células bajo diferentes estímulos. Sin embargo, existen varias líneas de investigación interesantes que son potencialmente explorables:

En la investigación con **humanos**, llevaremos a cabo un estudio dirigido a establecer la **utilidad diagnóstica y pronóstica** de LXR en una muestra amplia de pacientes con EII, incluyendo como controles pacientes con patología inflamatoria como colitis infecciosa y diverticulitis. Así mismo, es interesante ampliar la valoración descriptiva de LXR en **otros órganos** como el íleon, del cual pueden tomarse biopsias en la misma colonoscopia, y está también implicado en la inflamación que ocurre en la EC. Por otro lado, la valoración en **piezas quirúrgicas** de pacientes con determinadas situaciones clínicas como el brote fulminante de colitis, cáncer de colon, o la displasia de alto grado parece interesante. Además permitiría evaluar el gradiente cripta-epitelio de los receptores nucleares (257), con posible implicación clínica. La relación entre LXR y **displasia del epitelio cólico**, y entre los niveles de LXR en el segmento sano y la **progresión proximal de la CU**, son aspectos relevantes que serán explorados. Según lo evaluado en este trabajo, una de las vías relacionadas con la apoptosis parece relacionada con el eje LXR-ABCA1, y un estudio retrospectivo que pudiese demostrar alteración de estos receptores años antes de la aparición de la displasia sería de gran utilidad clínica. Así mismo, la **regulación** del propio LXR se desconoce, y podría estar relacionada con la microbiota y el butirato como se ha expuesto previamente, pero también podría relacionarse con los **microARN**, ácidos nucleicos no codificantes que participan en la diferenciación celular, proliferación, apoptosis y otras rutas metabólicas como la síntesis de triglicéridos y colesterol (258). Así, hay creciente

interés actualmente por la posible implicación de los microARN en el desarrollo de procesos inflamatorios como la EII, ya que cumplen importantes funciones en la organización epitelial y en la función de barrera del epitelio intestinal (259). Además, se ha identificado que LXR α es un gen diana del microARN 155, y los ratones deficientes en este microARN presentan niveles más altos tanto de LXR α como de ABCA1 (260), constituyendo una posible vía de regulación de LXR. De hecho, el microARN 155 ha mostrado importantes funciones pro-inflamatorias en macrófagos intestinales derivados de biopsias de pacientes con EII (261). Por último, el estudio de **polimorfismos del gen LXR** en pacientes con EII también puede ayudar a entender la patogenia de la enfermedad. De hecho, un estudio danés sugirió que la presencia de polimorfismos de LXR condiciona un aumento de riesgo de padecer EII (262).

En **ratones** nuestro estudio podría ir dirigido a un **estudio experimental** en ratones con un agonista de LXR. Estudios previos han utilizado el GW3965 por sondaje gástrico durante 4-10 días a una dosis de 30 mg/kg (141, 171, 263), mientras que otros han utilizado el agonista T0901317 por vía intraperitoneal a una dosis de 30-50 mg/kg durante 3-7 días (264, 265) o incluso un agonista exclusivamente intestinal (141). Con un tamaño muestral adecuado, incluyendo ratones salvajes e IL-10^{-/-} y probablemente manteniendo un tiempo de tratamiento largo por el carácter crónico de nuestro modelo esperamos obtener conclusiones sobre la capacidad de LXR de revertir la inflamación ileocólica. Además podríamos completar la valoración de estos ratones con **medición de la permeabilidad intestinal *in vivo*** utilizando fluoresceína isotiocianato (FITC)-dextrano, una molécula que se administra por vía oral y difunde pasivamente a través del epitelio intestinal, pudiendo ser analizada en el plasma por fluorimetría (266). Por otro

lado, el estudio de LXR en ratones de **edades más precoces** en los que la inflamación aún no se haya establecido puede ayudar a establecer el valor de LXR en el inicio de la inflamación epitelial. Por último, la utilización de **ratones modificados genéticamente** para que no expresen LXR $\alpha\beta$, LXR α o LXR β , así como ratones deficientes en ABCA1, puede aportar información muy valiosa y dar más solidez a las conclusiones de este trabajo.

El estudio en **células** irá encaminado a dilucidar aspectos mecanísticos del efecto de LXR. La cuantificación del **colesterol celular** acumulado por medio del uso de filipina, un compuesto fluorescente que se une específicamente al colesterol; e incluso el estudio de las balsas lipídicas. La utilización de un **siARN** para ABCA1 en el cultivo celular también complementará el estudio con glibenclamida, su inhibidor farmacológico. En nuestro laboratorio hemos desarrollado la técnica de valoración de la **resistencia transepitelial** en una monocapa de células epiteliales en cultivo de dispositivos *transwell*, que permite valorar la resistencia de la monocapa y es equiparable a la permeabilidad de la misma. Se podrían realizar experimentos dirigidos a valorar dicha permeabilidad tras la estimulación con IL1- β , ya que se ha demostrado que altera la función de barrera (200), y su cambio con la activación de LXR. La disrupción de la barrera epitelial intestinal que ocurre de manera precoz en los procesos inflamatorios podría estar condicionada por los cambios de expresión de LXR y del colesterol de membrana con consiguiente disrupción de las balsas lipídicas (267).

9 CONCLUSIONES

- El receptor LXR puede jugar un papel relevante en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal como pone de manifiesto su menor expresión génica y proteica en el colon de pacientes con dicha enfermedad y su relación con la actividad endoscópica e histológica.
- Tanto la expresión génica como la función de LXR en el colon de ratones deficientes en interleucina 10 están disminuidas, lo que se correlaciona de forma inversa con los niveles tisulares de expresión de interleucina 1 β ; ello sugiere una potencial asociación entre la pérdida de función de LXR y la presencia de actividad inflamatoria.
- La activación farmacológica de LXR inhibe la síntesis de quimiocinas pro-inflamatorias en células epiteliales en cultivo estimuladas con interleucina 1 β , por lo que LXR puede constituir una nueva diana terapéutica en la enfermedad inflamatoria intestinal.
- Las vías efectoras de NF- κ B y MAP quinasas son las responsables de dicho efecto anti-inflamatorio, y la conocida relevancia patogénica de estas vías hace especialmente pertinente el planteamiento de la terapia de activación de LXR en la enfermedad inflamatoria intestinal.
- Se ha identificado ABCA1 como una molécula clave en la acción anti-inflamatoria y anti-proliferativa de la vía de LXR.

10 REFERENCIAS

1. Ivanov AI. Structure and regulation of intestinal epithelial tight junctions: current concepts and unanswered questions. *Adv Exp Med Biol.* 2012;763:132-48.
2. Lechuga S, Ivanov AI. Disruption of the epithelial barrier during intestinal inflammation: Quest for new molecules and mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1864(7):1183-94.
3. Farquhar MG, Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 1963;17:375-412.
4. Rodriguez-Feo JA, Puerto M, Fernandez-Mena C, Verdejo C, Lara JM, Diaz-Sanchez M, et al. A new role for reticulon-4B/NOGO-B in the intestinal epithelial barrier function and inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;308(12):G981-93.
5. Andrews C, McLean MH, Durum SK. Cytokine Tuning of Intestinal Epithelial Function. *Front Immunol.* 2018;9:1270.
6. Gomollon F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis.* 2017;11(1):3-25.
7. Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J Crohns Colitis.* 2017;11(6):649-70.
8. Ferrante M, Declerck S, De Hertogh G, Van Assche G, Geboes K, Rutgeerts P, et al. Outcome after proctocolectomy with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14(1):20-8.
9. Gan SI, Beck PL. A new look at toxic megacolon: an update and review of incidence, etiology, pathogenesis, and management. *Am J Gastroenterol.* 2003;98(11):2363-71.

10. Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, Rumbles S, Schofield G, Kamm MA, et al. Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1030-8.
11. Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, Andrews HA, Allan RN. Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut*. 1994;35(11):1590-2.
12. Vavricka SR, Brun L, Ballabeni P, Pittet V, Prinz Vavricka BM, Zeitz J, et al. Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(1):110-9.
13. Hedrick TL, Friel CM. Colonic crohn disease. *Clin Colon Rectal Surg*. 2013;26(2):84-9.
14. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Yu N. The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(4):1116-22.
15. Pariente B, Cosnes J, Danese S, Sandborn WJ, Lewin M, Fletcher JG, et al. Development of the Crohn's disease digestive damage score, the Lemann score. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(6):1415-22.
16. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2018;390(10114):2769-78.
17. Chaparro M, Barreiro-de Acosta M, Benitez JM, Cabriada JL, Casanova MJ, Ceballos D, et al. EpidemIBD: rationale and design of a large-scale epidemiological study of inflammatory bowel disease in Spain. *Therap Adv Gastroenterol*. 2019;12:1756284819847034.
18. Severs M, Spekhorst LM, Mangen MJ, Dijkstra G, Lowenberg M, Hoentjen F, et al. Sex-Related Differences in Patients With Inflammatory Bowel Disease: Results of 2 Prospective Cohort Studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2018;24(6):1298-306.
19. Wagtmans MJ, Verspaget HW, Lamers CB, van Hogezaand RA. Gender-related differences in the clinical course of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(5):1541-6.
20. Saro Gismera C RMS, Milla Crespo A, Sánchez Fernández R, Lacort Fernández M, Argüelles Fernández G et al. . Incidence and prevalence of

inflammatory bowel disease. Asturian study in 5 cases (EIICEA). Spain. *An Med Interna*. 2003;20(1):3-9.

21. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411(6837):603-6.

22. Cooney R, Baker J, Brain O, Danis B, Pichulik T, Allan P, et al. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med*. 2010;16(1):90-7.

23. Shaw MH, Kamada N, Warner N, Kim YG, Nunez G. The ever-expanding function of NOD2: autophagy, viral recognition, and T cell activation. *Trends Immunol*. 2011;32(2):73-9.

24. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*. 2007;39(2):207-11.

25. McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P, et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat Genet*. 2008;40(9):1107-12.

26. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*. 2011;43(3):246-52.

27. Birrenbach T, Bocker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10(6):848-59.

28. Nunes T, Etchevers MJ, Domenech E, Garcia-Sanchez V, Ber Y, Penalva M, et al. Smoking does influence disease behaviour and impacts the need for therapy in Crohn's disease in the biologic era. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013;38(7):752-60.

29. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(11):1462-71.

30. Swanson GR, Sedghi S, Farhadi A, Keshavarzian A. Pattern of alcohol consumption and its effect on gastrointestinal symptoms in inflammatory bowel disease. *Alcohol*. 2010;44(3):223-8.

31. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(12):2687-92.
32. Fell JM, Paintin M, Arnaud-Battandier F, Beattie RM, Hollis A, Kitching P, et al. Mucosal healing and a fall in mucosal pro-inflammatory cytokine mRNA induced by a specific oral polymeric diet in paediatric Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000;14(3):281-9.
33. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(1):91-9.
34. Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Folsch UR, et al. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004;53(5):685-93.
35. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux JJ, et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(43):16731-6.
36. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, et al. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*. 2003;52(2):237-42.
37. Khan KJ, Ullman TA, Ford AC, Abreu MT, Abadir A, Marshall JK, et al. Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(4):661-73.
38. Dassopoulos T, Frangakis C, Cruz-Correa M, Talor MV, Burek CL, Datta L, et al. Antibodies to *saccharomyces cerevisiae* in Crohn's disease: higher titers are associated with a greater frequency of mutant NOD2/CARD15 alleles and with a higher probability of complicated disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(2):143-51.
39. Targan SR, Landers CJ, Yang H, Lodes MJ, Cong Y, Papadakis KA, et al. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2005;128(7):2020-8.
40. Mow WS, Vasiliasukas EA, Lin YC, Fleshner PR, Papadakis KA, Taylor KD, et al. Association of antibody responses to microbial antigens and complications of small bowel Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2004;126(2):414-24.

41. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1989;170:2-6; discussion 16-9.
42. Lee HS, Choe J, Lee HJ, Hwang SW, Park SH, Yang DH, et al. Change in the diagnosis of inflammatory bowel disease: a hospital-based cohort study from Korea. *Intest Res.* 2016;14(3):258-63.
43. Moum B, Ekbom A, Vatn MH, Aadland E, Sauar J, Lygren I, et al. Inflammatory bowel disease: re-evaluation of the diagnosis in a prospective population based study in south eastern Norway. *Gut.* 1997;40(3):328-32.
44. Braveman JM, Schoetz DJ, Jr., Marcello PW, Roberts PL, Collier JA, Murray JJ, et al. The fate of the ileal pouch in patients developing Crohn's disease. *Dis Colon Rectum.* 2004;47(10):1613-9.
45. Bryant RV, Winer S, Travis SP, Riddell RH. Systematic review: histological remission in inflammatory bowel disease. Is 'complete' remission the new treatment paradigm? An IOIBD initiative. *J Crohns Colitis.* 2014;8(12):1582-97.
46. Roda G, Narula N, Pinotti R, Skamnelos A, Katsanos KH, Ungaro R, et al. Systematic review with meta-analysis: proximal disease extension in limited ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2017;45(12):1481-92.
47. Menchen L, Colon AL, Madrigal JL, Beltran L, Botella S, Lizasoain I, et al. Activity of inducible and neuronal nitric oxide synthases in colonic mucosa predicts progression of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(9):1756-64.
48. Harbord M, Eliakim R, Bettenworth D, Karmiris K, Katsanos K, Kopylov U, et al. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management. *J Crohns Colitis.* 2017;11(7):769-84.
49. Denson LA, Long MD, McGovern DP, Kugathasan S, Wu GD, Young VB, et al. Challenges in IBD research: update on progress and prioritization of the CCFA's research agenda. *Inflamm Bowel Dis.* 2013;19(4):677-82.
50. Xu J, Lin H, Feng X, Tang M, Shen J, Ran Z. Different therapeutic approaches on quality of life in patients with inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol.* 2014;14:199.
51. Bouguen G, Peyrin-Biroulet L. Surgery for adult Crohn's disease: what is the actual risk? *Gut.* 2011;60(9):1178-81.

52. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75(2):263-74.
53. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med*. 2009;361(21):2033-45.
54. Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, Muller W, Menon S, Holland G, et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest*. 1996;98(4):1010-20.
55. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neirynck S, Obermeier F, Falk W, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*. 2000;289(5483):1352-5.
56. Davidson NJ, Leach MW, Fort MM, Thompson-Snipes L, Kuhn R, Muller W, et al. T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J Exp Med*. 1996;184(1):241-51.
57. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1310-6.
58. Wilson MS, Ramalingam TR, Rivollier A, Shenderov K, Mentink-Kane MM, Madala SK, et al. Colitis and intestinal inflammation in IL10^{-/-} mice results from IL-13 α 2-mediated attenuation of IL-13 activity. *Gastroenterology*. 2011;140(1):254-64.
59. Karrasch T, Kim JS, Muhlbauer M, Magness ST, Jobin C. Gnotobiotic IL-10^{-/-};NF-kappa B(EGFP) mice reveal the critical role of TLR/NF-kappa B signaling in commensal bacteria-induced colitis. *J Immunol*. 2007;178(10):6522-32.
60. Uronis JM, Muhlbauer M, Herfarth HH, Rubinas TC, Jones GS, Jobin C. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One*. 2009;4(6):e6026.
61. Hoshi N, Schenten D, Nish SA, Walther Z, Gagliani N, Flavell RA, et al. MyD88 signalling in colonic mononuclear phagocytes drives colitis in IL-10-deficient mice. *Nat Commun*. 2012;3:1120.
62. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and

immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun.* 1998;66(11):5224-31.

63. Hoentjen F, Harmsen HJ, Braat H, Torrice CD, Mann BA, Sartor RB, et al. Antibiotics with a selective aerobic or anaerobic spectrum have different therapeutic activities in various regions of the colon in interleukin 10 gene deficient mice. *Gut.* 2003;52(12):1721-7.

64. Salim SY, Soderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(1):362-81.

65. Jankowski JA, Bedford FK, Boulton RA, Cruickshank N, Hall C, Elder J, et al. Alterations in classical cadherins associated with progression in ulcerative and Crohn's colitis. *Lab Invest.* 1998;78(9):1155-67.

66. Zhang C, Liu LW, Sun WJ, Qin SH, Qin LZ, Wang X. Expressions of E-cadherin, p120ctn, beta-catenin and NF-kappaB in ulcerative colitis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2015;35(3):368-73.

67. Gassler N, Rohr C, Schneider A, Kartenbeck J, Bach A, Obermuller N, et al. Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(1):G216-28.

68. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut.* 2007;56(1):61-72.

69. Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol.* 2001;159(6):2001-9.

70. Consortium UIG, Barrett JC, Lee JC, Lees CW, Prescott NJ, Anderson CA, et al. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet.* 2009;41(12):1330-4.

71. Muise AM, Walters TD, Glowacka WK, Griffiths AM, Ngan BY, Lan H, et al. Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease. *Gut.* 2009;58(8):1121-7.

72. Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol Biol Cell*. 2004;15(1):176-88.
73. Utech M, Ivanov AI, Samarin SN, Bruewer M, Turner JR, Mrsny RJ, et al. Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell*. 2005;16(10):5040-52.
74. Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. *Scand J Gastroenterol*. 2002;37(9):1034-41.
75. Vrakas S, Mountzouris KC, Michalopoulos G, Karamanolis G, Papatheodoridis G, Tzathas C, et al. Intestinal Bacteria Composition and Translocation of Bacteria in Inflammatory Bowel Disease. *PLoS One*. 2017;12(1):e0170034.
76. Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol*. 2005;43(7):3380-9.
77. Strugnell RA, Wijburg OL. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(9):656-67.
78. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000;343(5):338-44.
79. Sieling PA, Modlin RL. Toll-like receptors: mammalian "taste receptors" for a smorgasbord of microbial invaders. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5(1):70-5.
80. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal*. 2010;3(105):cm1.
81. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*. 2000;68(12):7010-7.
82. Lakatos PL, Kiss LS, Palatka K, Altorjay I, Antal-Szalmas P, Palyu E, et al. Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(3):767-77.

83. El-Khider F, McDonald C. Links of Autophagy Dysfunction to Inflammatory Bowel Disease Onset. *Dig Dis*. 2016;34(1-2):27-34.
84. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, et al. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):18129-34.
85. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*. 2008;456(7219):259-63.
86. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet*. 2007;39(5):596-604.
87. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, et al. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*. 2007;8(9):967-74.
88. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, et al. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2008;57(12):1682-9.
89. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):141-53.
90. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*. 2008;214(2):149-60.
91. Poggioli G, Laureti S, Campieri M, Pierangeli F, Gionchetti P, Ugolini F, et al. Infliximab in the treatment of Crohn's disease. *Ther Clin Risk Manag*. 2007;3(2):301-8.
92. Adegbola SO, Sahnun K, Warusavitarne J, Hart A, Tozer P. Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8).
93. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, et al. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med*. 2000;6(5):583-8.
94. McAlindon ME, Hawkey CJ, Mahida YR. Expression of interleukin 1 beta and interleukin 1 beta converting enzyme by intestinal macrophages in health and inflammatory bowel disease. *Gut*. 1998;42(2):214-9.

95. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003;52(1):65-70.
96. Sandborn WJ, Gasink C, Gao LL, Blank MA, Johanns J, Guzzo C, et al. Ustekinumab induction and maintenance therapy in refractory Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2012;367(16):1519-28.
97. Kole A, Maloy KJ. Control of intestinal inflammation by interleukin-10. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;380:19-38.
98. Keubler LM, Buettner M, Hager C, Bleich A. A Multihit Model: Colitis Lessons from the Interleukin-10-deficient Mouse. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(8):1967-75.
99. Fang YH, Luo YY, Yu JD, Lou JG, Chen J. Phenotypic and genotypic characterization of inflammatory bowel disease in children under six years of age in China. *World J Gastroenterol*. 2018;24(9):1035-45.
100. Rani R, Smulian AG, Greaves DR, Hogan SP, Herbert DR. TGF-beta limits IL-33 production and promotes the resolution of colitis through regulation of macrophage function. *Eur J Immunol*. 2011;41(7):2000-9.
101. Del Zotto B, Mumolo G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, Boirivant M. TGF-beta1 production in inflammatory bowel disease: differing production patterns in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*. 2003;134(1):120-6.
102. Schuerer-Maly CC, Eckmann L, Kagnoff MF, Falco MT, Maly FE. Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology*. 1994;81(1):85-91.
103. Mahida YR, Ceska M, Effenberger F, Kurlak L, Lindley I, Hawkey CJ. Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis. *Clin Sci (Lond)*. 1992;82(3):273-5.
104. Ogawa H, Iimura M, Eckmann L, Kagnoff MF. Regulated production of the chemokine CCL28 in human colon epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287(5):G1062-9.
105. Latchman DS. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29(12):1305-12.
106. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83(6):835-9.

107. Okayasu I, Hana K, Nemoto N, Yoshida T, Saegusa M, Yokota-Nakatsuma A, et al. Vitamin A Inhibits Development of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis and Colon Cancer in a Mouse Model. *Biomed Res Int*. 2016;2016:4874809.
108. Reifen R, Nur T, Ghebermeskel K, Zaiger G, Urizky R, Pines M. Vitamin A deficiency exacerbates inflammation in a rat model of colitis through activation of nuclear factor-kappaB and collagen formation. *J Nutr*. 2002;132(9):2743-7.
109. Knackstedt R, Shaoli S, Moseley V, Wargovich M. The importance of the retinoid X receptor alpha in modulating inflammatory signaling in acute murine colitis. *Dig Dis Sci*. 2014;59(4):753-9.
110. Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutton S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, et al. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med*. 2001;193(7):827-38.
111. Gubatan J, Mitsuhashi S, Zenlea T, Rosenberg L, Robson S, Moss AC. Low Serum Vitamin D During Remission Increases Risk of Clinical Relapse in Patients With Ulcerative Colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15(2):240-6 e1.
112. Ananthakrishnan AN, Cagan A, Gainer VS, Cai T, Cheng SC, Savova G, et al. Normalization of plasma 25-hydroxy vitamin D is associated with reduced risk of surgery in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(9):1921-7.
113. Kim JH, Yamaori S, Tanabe T, Johnson CH, Krausz KW, Kato S, et al. Implication of intestinal VDR deficiency in inflammatory bowel disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(1):2118-28.
114. Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, Rakotobe S, Karoui M, Colombel JF, et al. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1265-76.
115. Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, et al. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest*. 1999;104(4):383-9.
116. Lewis JD, Lichtenstein GR, Deren JJ, Sands BE, Hanauer SB, Katz JA, et al. Rosiglitazone for active ulcerative colitis: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology*. 2008;134(3):688-95.

117. Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, Lefebvre P, Romano O, Auwerx J, et al. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Exp Med*. 2005;201(8):1205-15.
118. Prantera C, Lochs H, Campieri M, Scribano ML, Sturniolo GC, Castiglione F, et al. Antibiotic treatment of Crohn's disease: results of a multicentre, double blind, randomized, placebo-controlled trial with rifaximin. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;23(8):1117-25.
119. Shah YM, Ma X, Morimura K, Kim I, Gonzalez FJ. Pregnane X receptor activation ameliorates DSS-induced inflammatory bowel disease via inhibition of NF-kappaB target gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(4):G1114-22.
120. Terc J, Hansen A, Alston L, Hirota SA. Pregnane X receptor agonists enhance intestinal epithelial wound healing and repair of the intestinal barrier following the induction of experimental colitis. *Eur J Pharm Sci*. 2014;55:12-9.
121. Harnish DC, Albert LM, Leathurby Y, Eckert AM, Ciarletta A, Kasaian M, et al. Beneficial effects of estrogen treatment in the HLA-B27 transgenic rat model of inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286(1):G118-25.
122. Ford AC, Bernstein CN, Khan KJ, Abreu MT, Marshall JK, Talley NJ, et al. Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(4):590-9; quiz 600.
123. Vavassori P, Mencarelli A, Renga B, Distrutti E, Fiorucci S. The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J Immunol*. 2009;183(10):6251-61.
124. Wildenberg ME, van den Brink GR. FXR activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in IBD. *Gut*. 2011;60(4):432-3.
125. Khalili H, Ananthakrishnan AN, Konijeti GG, Higuchi LM, Fuchs CS, Richter JM, et al. Endogenous levels of circulating androgens and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis among women: a nested case-control study from the nurses' health study cohorts. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(6):1378-85.
126. Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, Ortiz MA, Salbert G, Pfahl M. A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and

its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol.* 1994;14(10):7025-35.

127. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature.* 1996;383(6602):728-31.

128. Parikh M, Patel K, Soni S, Gandhi T. Liver X receptor: a cardinal target for atherosclerosis and beyond. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21(6):519-31.

129. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, et al. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(1):266-71.

130. Fan X, Kim HJ, Bouton D, Warner M, Gustafsson JA. Expression of liver X receptor beta is essential for formation of superficial cortical layers and migration of later-born neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(36):13445-50.

131. Korach-Andre M, Gustafsson JA. Liver X receptors as regulators of metabolism. *Biomol Concepts.* 2015;6(3):177-90.

132. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 1995;9(9):1033-45.

133. Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol Rev.* 2006;86(2):465-514.

134. Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, et al. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature.* 2007;445(7124):219-23.

135. Plat J, Nichols JA, Mensink RP. Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J Lipid Res.* 2005;46(11):2468-76.

136. Song C, Hiipakka RA, Liao S. Selective activation of liver X receptor alpha by 6alpha-hydroxy bile acids and analogs. *Steroids.* 2000;65(8):423-7.

137. Molteni V, Li X, Nabakka J, Liang F, Wityak J, Koder A, et al. N-Acylthiadiazolines, a new class of liver X receptor agonists with selectivity for LXRbeta. *J Med Chem.* 2007;50(17):4255-9.

138. Collins JL, Fivush AM, Watson MA, Galardi CM, Lewis MC, Moore LB, et al. Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem.* 2002;45(10):1963-6.

139. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* 2000;14(22):2831-8.
140. Kratzer A, Buchebner M, Pfeifer T, Becker TM, Uray G, Miyazaki M, et al. Synthetic LXR agonist attenuates plaque formation in apoE^{-/-} mice without inducing liver steatosis and hypertriglyceridemia. *J Lipid Res.* 2009;50(2):312-26.
141. Yasuda T, Grillot D, Billheimer JT, Briand F, Delerive P, Huet S, et al. Tissue-specific liver X receptor activation promotes macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(4):781-6.
142. Zhao C, Dahlman-Wright K. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J Endocrinol.* 2010;204(3):233-40.
143. Basso F, Freeman L, Knapper CL, Remaley A, Stonik J, Neufeld EB, et al. Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J Lipid Res.* 2003;44(2):296-302.
144. Klucken J, Buchler C, Orso E, Kaminski WE, Porsch-Ozcurumez M, Liebisch G, et al. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(2):817-22.
145. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, et al. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(2):507-12.
146. Albers JJ, Vuletich S, Cheung MC. Role of plasma phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(3):345-57.
147. Barbier O, Trottier J, Kaeding J, Caron P, Verreault M. Lipid-activated transcription factors control bile acid glucuronidation. *Mol Cell Biochem.* 2009;326(1-2):3-8.
148. van der Veen JN, van Dijk TH, Vrans CL, van Meer H, Havinga R, Bijsterveld K, et al. Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem.* 2009;284(29):19211-9.
149. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, et al. Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(25):16237-42.

150. Duval C, Touche V, Tailleux A, Fruchart JC, Fievet C, Clavey V, et al. Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(4):1259-63.
151. Beaven SW, Matveyenko A, Wroblewski K, Chao L, Wilpitz D, Hsu TW, et al. Reciprocal regulation of hepatic and adipose lipogenesis by liver X receptors in obesity and insulin resistance. *Cell Metab*. 2013;18(1):106-17.
152. Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Tissue-specific induction of intestinal ABCA1 expression with a liver X receptor agonist raises plasma HDL cholesterol levels. *Circ Res*. 2006;99(7):672-4.
153. Breevoort SR, Angdisen J, Schulman IG. Macrophage-independent regulation of reverse cholesterol transport by liver X receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(8):1650-60.
154. Lo Sasso G, Murzilli S, Salvatore L, D'Errico I, Petruzzelli M, Conca P, et al. Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis. *Cell Metab*. 2010;12(2):187-93.
155. Liu Y, Yan C, Wang Y, Nakagawa Y, Nerio N, Anghel A, et al. Liver X receptor agonist T0901317 inhibition of glucocorticoid receptor expression in hepatocytes may contribute to the amelioration of diabetic syndrome in db/db mice. *Endocrinology*. 2006;147(11):5061-8.
156. Laffitte BA, Chao LC, Li J, Walczak R, Hummasti S, Joseph SB, et al. Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5419-24.
157. Cao G, Liang Y, Broderick CL, Oldham BA, Beyer TP, Schmidt RJ, et al. Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem*. 2003;278(2):1131-6.
158. Grefhorst A, van Dijk TH, Hammer A, van der Sluijs FH, Havinga R, Havekes LM, et al. Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;289(5):E829-38.
159. Vedin LL, Lewandowski SA, Parini P, Gustafsson JA, Steffensen KR. The oxysterol receptor LXR inhibits proliferation of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2009;30(4):575-9.

160. Fukuchi J, Kokontis JM, Hiipakka RA, Chuu CP, Liao S. Antiproliferative effect of liver X receptor agonists on LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64(21):7686-9.
161. Pommier AJ, Alves G, Viennois E, Bernard S, Communal Y, Sion B, et al. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene.* 2010;29(18):2712-23.
162. Lo Sasso G, Bovenga F, Murzilli S, Salvatore L, Di Tullio G, Martelli N, et al. Liver X receptors inhibit proliferation of human colorectal cancer cells and growth of intestinal tumors in mice. *Gastroenterology.* 2013;144(7):1497-507, 507 e1-13.
163. Uno S, Endo K, Jeong Y, Kawana K, Miyachi H, Hashimoto Y, et al. Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(2):186-95.
164. Derangere V, Chevriaux A, Courtaut F, Bruchard M, Berger H, Chalmin F, et al. Liver X receptor beta activation induces pyroptosis of human and murine colon cancer cells. *Cell Death Differ.* 2014;21(12):1914-24.
165. Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem.* 2003;278(12):10443-9.
166. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med.* 2003;9(2):213-9.
167. Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, Haberland M, Fogelman AM, Cheng G, et al. Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell.* 2003;12(4):805-16.
168. Khovidhunkit W, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR. Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages: differential role of LXR. *J Lipid Res.* 2003;44(9):1728-36.
169. Marathe C, Bradley MN, Hong C, Lopez F, Ruiz de Galarreta CM, Tontonoz P, et al. The arginase II gene is an anti-inflammatory target of liver X receptor in macrophages. *J Biol Chem.* 2006;281(43):32197-206.
170. Fowler AJ, Sheu MY, Schmuth M, Kao J, Fluhr JW, Rhein L, et al. Liver X receptor activators display anti-inflammatory activity in irritant and allergic

contact dermatitis models: liver-X-receptor-specific inhibition of inflammation and primary cytokine production. *J Invest Dermatol*. 2003;120(2):246-55.

171. Jakobsson T, Vedin LL, Hassan T, Venteclef N, Greco D, D'Amato M, et al. The oxysterol receptor LXRbeta protects against DSS- and TNBS-induced colitis in mice. *Mucosal Immunol*. 2014;7(6):1416-28.

172. Yu S, Li S, Henke A, Muse ED, Cheng B, Welzel G, et al. Dissociated sterol-based liver X receptor agonists as therapeutics for chronic inflammatory diseases. *FASEB J*. 2016;30(7):2570-9.

173. Wei X, Yang Z, Rey FE, Ridaura VK, Davidson NO, Gordon JI, et al. Fatty acid synthase modulates intestinal barrier function through palmitoylation of mucin 2. *Cell Host Microbe*. 2012;11(2):140-52.

174. Guillemot-Legris O, Mutemberezi V, Buisseret B, Paquot A, Palmieri V, Bottemanne P, et al. Colitis Alters Oxysterol Metabolism and is Affected by 4beta-Hydroxycholesterol Administration. *J Crohns Colitis*. 2019;13(2):218-29.

175. Oram JF. HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(5):720-7.

176. Francone OL, Royer L, Boucher G, Haghighpassand M, Freeman A, Brees D, et al. Increased cholesterol deposition, expression of scavenger receptors, and response to chemotactic factors in Abca1-deficient macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(6):1198-205.

177. Zhu X, Lee JY, Timmins JM, Brown JM, Boudyguina E, Mulya A, et al. Increased cellular free cholesterol in macrophage-specific Abca1 knock-out mice enhances pro-inflammatory response of macrophages. *J Biol Chem*. 2008;283(34):22930-41.

178. Ito A, Hong C, Rong X, Zhu X, Tarling EJ, Hedde PN, et al. LXRs link metabolism to inflammation through Abca1-dependent regulation of membrane composition and TLR signaling. *Elife*. 2015;4:e08009.

179. Lafont F, van der Goot FG. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol*. 2005;7(5):613-20.

180. Fu Y, Zhou E, Wei Z, Wang W, Wang T, Yang Z, et al. Cyanidin-3-O-beta-glucoside ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by reducing TLR4 recruitment into lipid rafts. *Biochem Pharmacol*. 2014;90(2):126-34.

181. Koseki M, Hirano K, Masuda D, Ikegami C, Tanaka M, Ota A, et al. Increased lipid rafts and accelerated lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α secretion in Abca1-deficient macrophages. *J Lipid Res.* 2007;48(2):299-306.
182. Hu X, Fu Y, Lu X, Zhang Z, Zhang W, Cao Y, et al. Protective Effects of Platycodin D on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Activating LXR α -ABCA1 Signaling Pathway. *Front Immunol.* 2016;7:644.
183. Zhu X, Owen JS, Wilson MD, Li H, Griffiths GL, Thomas MJ, et al. Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol. *J Lipid Res.* 2010;51(11):3196-206.
184. Tang C, Liu Y, Kessler PS, Vaughan AM, Oram JF. The macrophage cholesterol exporter ABCA1 functions as an anti-inflammatory receptor. *J Biol Chem.* 2009;284(47):32336-43.
185. Liu Y, Tang C. Regulation of ABCA1 functions by signaling pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(3):522-9.
186. Field FJ, Watt K, Mathur SN. TNF- α decreases ABCA1 expression and attenuates HDL cholesterol efflux in the human intestinal cell line Caco-2. *J Lipid Res.* 2010;51(6):1407-15.
187. Chen M, Li W, Wang N, Zhu Y, Wang X. ROS and NF- κ B but not LXR mediate IL-1 β signaling for the downregulation of ATP-binding cassette transporter A1. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(4):C1493-501.
188. Li YC, Park MJ, Ye SK, Kim CW, Kim YN. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am J Pathol.* 2006;168(4):1107-18; quiz 404-5.
189. Committee ASoP, Saltzman JR, Cash BD, Pasha SF, Early DS, Muthusamy VR, et al. Bowel preparation before colonoscopy. *Gastrointest Endosc.* 2015;81(4):781-94.
190. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut.* 2006;55(6):749-53.
191. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med.* 1987;317(26):1625-9.

192. Sandborn WJ, Tremaine WJ, Schroeder KW, Steiner BL, Batts KP, Lawson GM. Cyclosporine enemas for treatment-resistant, mildly to moderately active, left-sided ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*. 1993;88(5):640-5.
193. Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Dutt S, Herd ME. Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut*. 1991;32(2):174-8.
194. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. *Lancet*. 1980;1(8167):514.
195. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc*. 2004;60(4):505-12.
196. Baars JE, Nuij VJ, Oldenburg B, Kuipers EJ, van der Woude CJ. Majority of patients with inflammatory bowel disease in clinical remission have mucosal inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(9):1634-40.
197. Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J Vis Exp*. 2012(60).
198. Pasparakis M. Role of NF-kappaB in epithelial biology. *Immunol Rev*. 2012;246(1):346-58.
199. Prufer K, Boudreaux J. Nuclear localization of liver X receptor alpha and beta is differentially regulated. *J Cell Biochem*. 2007;100(1):69-85.
200. Haines RJ, Beard RS, Jr., Chen L, Eitnier RA, Wu MH. Interleukin-1beta Mediates beta-Catenin-Driven Downregulation of Claudin-3 and Barrier Dysfunction in Caco2 Cells. *Dig Dis Sci*. 2016;61(8):2252-61.
201. Al-Sadi R, Ye D, Said HM, Ma TY. Cellular and molecular mechanism of interleukin-1beta modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier. *J Cell Mol Med*. 2011;15(4):970-82.
202. Terao Y, Ayaori M, Ogura M, Yakushiji E, Uto-Kondo H, Hisada T, et al. Effect of sulfonylurea agents on reverse cholesterol transport in vitro and vivo. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18(6):513-30.
203. de Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(1):13-27.
204. Ungaro R, Colombel JF, Lissos T, Peyrin-Biroulet L. A Treat-to-Target Update in Ulcerative Colitis: A Systematic Review. *Am J Gastroenterol*. 2019;114(6):874-83.

205. Bovenga F, Sabba C, Moschetta A. Uncoupling nuclear receptor LXR and cholesterol metabolism in cancer. *Cell Metab.* 2015;21(4):517-26.
206. Courtaut F, Derangere V, Chevriaux A, Ladoire S, Cotte AK, Arnould L, et al. Liver X receptor ligand cytotoxicity in colon cancer cells and not in normal colon epithelial cells depends on LXRBeta subcellular localization. *Oncotarget.* 2015;6(29):26651-62.
207. Chaparro M, Panes J, Garcia V, Manosa M, Esteve M, Merino O, et al. Long-term durability of infliximab treatment in Crohn's disease and efficacy of dose "escalation" in patients losing response. *J Clin Gastroenterol.* 2011;45(2):113-8.
208. Bernstein CN, Loftus EV, Jr., Ng SC, Lakatos PL, Moum B, Epidemiology, et al. Hospitalisations and surgery in Crohn's disease. *Gut.* 2012;61(4):622-9.
209. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology.* 1994;107(1):3-11.
210. Grefhorst A, Elzinga BM, Voshol PJ, Plosch T, Kok T, Bloks VW, et al. Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem.* 2002;277(37):34182-90.
211. Quinet EM, Savio DA, Halpern AR, Chen L, Miller CP, Nambi P. Gene-selective modulation by a synthetic oxysterol ligand of the liver X receptor. *J Lipid Res.* 2004;45(10):1929-42.
212. Bopanna S, Roy M, Das P, Dattagupta S, Sreenivas V, Mouli VP, et al. Role of random biopsies in surveillance of dysplasia in ulcerative colitis patients with high risk of colorectal cancer. *Intest Res.* 2016;14(3):264-9.
213. Bryant RV, Burger DC, Delo J, Walsh AJ, Thomas S, von Herbay A, et al. Beyond endoscopic mucosal healing in UC: histological remission better predicts corticosteroid use and hospitalisation over 6 years of follow-up. *Gut.* 2016;65(3):408-14.
214. Zenlea T, Yee EU, Rosenberg L, Boyle M, Nanda KS, Wolf JL, et al. Histology Grade Is Independently Associated With Relapse Risk in Patients With Ulcerative Colitis in Clinical Remission: A Prospective Study. *Am J Gastroenterol.* 2016;111(5):685-90.

215. Narang V, Kaur R, Garg B, Mahajan R, Midha V, Sood N, et al. Association of endoscopic and histological remission with clinical course in patients of ulcerative colitis. *Intest Res*. 2018;16(1):55-61.
216. Heimerl S, Moehle C, Zahn A, Boettcher A, Stremmel W, Langmann T, et al. Alterations in intestinal fatty acid metabolism in inflammatory bowel disease. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1762(3):341-50.
217. Helleboid-Chapman A, Helleboid S, Jakel H, Timmerman C, Sergheraert C, Pattou F, et al. Glucose regulates LXRA subcellular localization and function in rat pancreatic beta-cells. *Cell Res*. 2006;16(7):661-70.
218. Prufer K, Barsony J. Retinoid X receptor dominates the nuclear import and export of the unliganded vitamin D receptor. *Mol Endocrinol*. 2002;16(8):1738-51.
219. Bunn CF, Neidig JA, Freidinger KE, Stankiewicz TA, Weaver BS, McGrew J, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of the thyroid hormone receptor alpha. *Mol Endocrinol*. 2001;15(4):512-33.
220. Ehehalt R, Wagenblast J, Erben G, Lehmann WD, Hinz U, Merle U, et al. Phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in intestinal mucus of ulcerative colitis patients. A quantitative approach by nanoElectrospray-tandem mass spectrometry. *Scand J Gastroenterol*. 2004;39(8):737-42.
221. Lichtenberger LM. The hydrophobic barrier properties of gastrointestinal mucus. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:565-83.
222. Tomasello G, Mazzola M, Leone A, Sinagra E, Zummo G, Farina F, et al. Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2016;160(4):461-6.
223. Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW, Giardina C. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology*. 2000;118(4):724-34.
224. Venkatraman A, Ramakrishna BS, Shaji RV, Kumar NS, Pulimood A, Patra S. Amelioration of dextran sulfate colitis by butyrate: role of heat shock protein 70 and NF-kappaB. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285(1):G177-84.
225. Breuer RI, Soergel KH, Lashner BA, Christ ML, Hanauer SB, Vanagunas A, et al. Short chain fatty acid rectal irrigation for left-sided ulcerative colitis: a randomised, placebo controlled trial. *Gut*. 1997;40(4):485-91.

226. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*. 2009;58(7):1509-17.
227. Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C, Li S, et al. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 β coactivation of SREBP. *Cell*. 2005;120(2):261-73.
228. Schwab M, Reynders V, Loitsch S, Steinhilber D, Stein J, Schroder O. Involvement of different nuclear hormone receptors in butyrate-mediated inhibition of inducible NF kappa B signalling. *Mol Immunol*. 2007;44(15):3625-32.
229. Pan J, Kunkel EJ, Gossler U, Lazarus N, Langdon P, Broadwell K, et al. A novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. *J Immunol*. 2000;165(6):2943-9.
230. Hieshima K, Kawasaki Y, Hanamoto H, Nakayama T, Nagakubo D, Kanamaru A, et al. CC chemokine ligands 25 and 28 play essential roles in intestinal extravasation of IgA antibody-secreting cells. *J Immunol*. 2004;173(6):3668-75.
231. Ruiz PA, Shkoda A, Kim SC, Sartor RB, Haller D. IL-10 gene-deficient mice lack TGF- β /Smad-mediated TLR2 degradation and fail to inhibit proinflammatory gene expression in intestinal epithelial cells under conditions of chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1072:389-94.
232. Halvorsen B, Holm S, Yndestad A, Scholz H, Sagen EL, Nebb H, et al. Interleukin-10 increases reverse cholesterol transport in macrophages through its bidirectional interaction with liver X receptor α . *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;450(4):1525-30.
233. Jakobsson T, Treuter E, Gustafsson JA, Steffensen KR. Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol Sci*. 2012;33(7):394-404.
234. Xu Y, Hunt NH, Bao S. The role of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor in acute intestinal inflammation. *Cell Res*. 2008;18(12):1220-9.
235. O'Neill LA, Greene C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol*. 1998;63(6):650-7.
236. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519-50.

237. Bocker U, Yezersky O, Feick P, Manigold T, Panja A, Kalina U, et al. Responsiveness of intestinal epithelial cell lines to lipopolysaccharide is correlated with Toll-like receptor 4 but not Toll-like receptor 2 or CD14 expression. *Int J Colorectal Dis.* 2003;18(1):25-32.
238. Ludwiczek O, Vannier E, Borggraefe I, Kaser A, Siegmund B, Dinarello CA, et al. Imbalance between interleukin-1 agonists and antagonists: relationship to severity of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol.* 2004;138(2):323-9.
239. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology.* 1989;96(3):795-803.
240. Li L, Liu Z, Yang X, Yan H, Bao S, Fei J. Bioluminescence imaging for IL-1 β expression in experimental colitis. *J Inflamm (Lond).* 2013;10(1):16.
241. Cominelli F, Nast CC, Clark BD, Schindler R, Lierena R, Eysselein VE, et al. Interleukin 1 (IL-1) gene expression, synthesis, and effect of specific IL-1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis. *J Clin Invest.* 1990;86(3):972-80.
242. Tesoriere L, Attanzio A, Allegra M, Gentile C, Livrea MA. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibits NADPH oxidase (NOX)-1 activation and NF- κ B-dependent release of inflammatory mediators and prevents the increase of epithelial permeability in IL-1 β -exposed Caco-2 cells. *Br J Nutr.* 2014;111(3):415-23.
243. Wang Y, Moser AH, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR. Downregulation of liver X receptor- α in mouse kidney and HK-2 proximal tubular cells by LPS and cytokines. *J Lipid Res.* 2005;46(11):2377-87.
244. Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med.* 1996;2(9):998-1004.
245. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, et al. Nuclear factor κ B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology.* 1998;115(2):357-69.
246. Dahan S, Roda G, Pinn D, Roth-Walter F, Kamalu O, Martin AP, et al. Epithelial: lamina propria lymphocyte interactions promote epithelial cell differentiation. *Gastroenterology.* 2008;134(1):192-203.

247. Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *J Intern Med*. 2008;263(6):591-6.
248. Broom OJ, Widjaya B, Troelsen J, Olsen J, Nielsen OH. Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease? *Clin Exp Immunol*. 2009;158(3):272-80.
249. Vedin LL, Gustafsson JA, Steffensen KR. The oxysterol receptors LXRalpha and LXRbeta suppress proliferation in the colon. *Mol Carcinog*. 2013;52(11):835-44.
250. Lakatos PL, Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol*. 2008;14(25):3937-47.
251. Ekbohm A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*. 1990;323(18):1228-33.
252. Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, Rumbles S, Schofield G, Kamm M, et al. Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2004;126(2):451-9.
253. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*. 2007;448(7152):439-44.
254. Setia S, Nehru B, Sanyal SN. The PI3K/Akt pathway in colitis associated colon cancer and its chemoprevention with celecoxib, a Cox-2 selective inhibitor. *Biomed Pharmacother*. 2014;68(6):721-7.
255. Kakar S, Nehra V, Murray JA, Dayharsh GA, Burgart LJ. Significance of intraepithelial lymphocytosis in small bowel biopsy samples with normal mucosal architecture. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(9):2027-33.
256. Furuta GT, Liacouras CA, Collins MH, Gupta SK, Justinich C, Putnam PE, et al. Eosinophilic esophagitis in children and adults: a systematic review and consensus recommendations for diagnosis and treatment. *Gastroenterology*. 2007;133(4):1342-63.
257. D'Errico I, Moschetta A. Nuclear receptors, intestinal architecture and colon cancer: an intriguing link. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(10):1523-43.

258. Marques-Rocha JL, Samblas M, Milagro FI, Bressan J, Martinez JA, Marti A. Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. *FASEB J*. 2015;29(9):3595-611.
259. McKenna LB, Schug J, Vourekas A, McKenna JB, Bramswig NC, Friedman JR, et al. MicroRNAs control intestinal epithelial differentiation, architecture, and barrier function. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1654-64, 64 e1.
260. Kurowska-Stolarska M, Hasoo MK, Welsh DJ, Stewart L, McIntyre D, Morton BE, et al. The role of microRNA-155/liver X receptor pathway in experimental and idiopathic pulmonary fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(6):1946-56.
261. Pathak S, Grillo AR, Scarpa M, Brun P, D'Inca R, Nai L, et al. MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis. *Exp Mol Med*. 2015;47:e164.
262. Andersen V, Christensen J, Ernst A, Jacobsen BA, Tjonneland A, Krarup HB, et al. Polymorphisms in NF-kappaB, PXR, LXR, PPARgamma and risk of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2011;17(2):197-206.
263. Briand O, Touche V, Colin S, Brufau G, Davalos A, Schonewille M, et al. Liver X Receptor Regulates Triglyceride Absorption Through Intestinal Down-regulation of Scavenger Receptor Class B, Type 1. *Gastroenterology*. 2016;150(3):650-8.
264. Wu CH, Chen CC, Lai CY, Hung TH, Lin CC, Chao M, et al. Treatment with TO901317, a synthetic liver X receptor agonist, reduces brain damage and attenuates neuroinflammation in experimental intracerebral hemorrhage. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):62.
265. Xing Y, Zhao T, Gao X, Wu Y. Liver X receptor alpha is essential for the capillarization of liver sinusoidal endothelial cells in liver injury. *Sci Rep*. 2016;6:21309.
266. Volynets V, Reichold A, Bardos G, Rings A, Bleich A, Bischoff SC. Assessment of the Intestinal Barrier with Five Different Permeability Tests in Healthy C57BL/6J and BALB/cJ Mice. *Dig Dis Sci*. 2016;61(3):737-46.
267. Bowie RV, Donatello S, Lyes C, Owens MB, Babina IS, Hudson L, et al. Lipid rafts are disrupted in mildly inflamed intestinal microenvironments without overt disruption of the epithelial barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302(8):G781-93.

Este trabajo fue presentado en las siguientes reuniones:

Congresos nacionales:

- Póster en las IV Jornadas de Investigación e Innovación del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (diciembre 2015, Madrid). Receptores nucleares Liver X Receptors (LXR) en un modelo de enterocolitis crónica en ratón. José Miranda-Bautista, Juan Antonio Rodríguez Feo, Beatriz López Cauce, Marta Puerto Cantero, Carolina Fernández Mena, Javier Vaquero Martín, Rafael Bañares Cañizares, Luis Menchén.

- Póster en las V Jornadas de Investigación e Innovación del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (marzo 2017, Madrid). LXR-ABCA1: ¿una diana terapéutica en la enfermedad inflamatoria intestinal?. Juan Antonio Rodríguez Feo, José Miranda-Bautista, Beatriz López Cauce, Marta Puerto Cantero, Rafael Bañares Cañizares, Luis Menchén.

- Póster en la XXI Reunión Anual de la Asociación Española de Gastroenterología (marzo 2018, Madrid): LXR-ABCA1: una diana terapéutica en la enfermedad inflamatoria intestinal? José Miranda-Bautista, Juan A. Rodríguez-Feo, Marta Puerto, Beatriz López-Cauce, José Manuel Lara, Rafael Bañares, Luis Menchén.

Congresos internacionales:

- Póster en el Congreso de la European Crohn's and Colitis Organization 2018 (febrero 2018, Viena): LXR-ABCA1: a new therapeutic target in inflammatory bowel disease? José Miranda-Bautista, Juan A. Rodríguez-Feo, Beatriz López-Cauce, Marta Puerto, José Manuel Lara, Rafael Bañares, Luis Menchén.

- Póster en Digestive Diseases Week 2018 (junio 2018, Washington): LXR-ABCA1: a new therapeutic target in inflammatory bowel disease? José Miranda-Bautista, Juan A. Rodríguez-Feo, Beatriz López-Cauce, Marta Puerto, José Manuel Lara, Rafael Bañares, Luis Menchén.